

BINDUNGSSTUDIEN MIT ^3H -OUABAIN
AN INTAKTEN MENSCHLICHEN
MONONUKLEÄREN LEUKOZYTEN

Karin Ludwig

Diss
München
1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554813_0020

Aus der Medizinischen Klinik I der Universität München

Klinikum Großhadern

Direktor: Prof. Dr. med. G. Riecker

BINDUNGSSTUDIEN MIT ^3H -OUABAIN AN INTAKTEN
MENSCHLICHEN MONONUKLEÄREN LEUKOZYTEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Karin Ludwig

aus

München

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. E. Erdmann
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. G. Riecker
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juli 1985

MEINEN ELTERN IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. EINLEITUNG	1
2. METHODIK	5
2.1. Materialien	5
2.2. Messung der Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten	6
2.2.1. Präparation menschlicher mononukleärer Leukozyten	6
2.2.2. Modifikationen der Präparationsmethode	7
2.2.3. Zeitabhängige Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten	8
2.2.4. Konzentrationsabhängige Bindung	9
2.2.5. Aufbereitung der Proben und Meßverfahren	10
2.2.6. Bestimmung des im Inkubationsmedium maximal vorhandenen ^3H -Ouabains	11
2.2.7. Definition der unspezifischen Bindung	11
2.2.8. Messung der Assoziation des ^3H -Ouabain- Rezeptor-Komplexes	12
2.2.9. Messung der Dissoziation des ^3H -Ouabain- Rezeptor-Komplexes	12
2.3. Differenzierung der Zellsuspension und Beurteilung der Vitalität der Zellen	14
2.3.1. Aufbringen der Zellen auf Objektträger	14
2.3.2. Färbung nach Pappenheim	14
2.3.3. Thrombozytenzählung	15
2.3.4. Naphthol-AS-Acetat-Esterase-Färbung	15
2.3.5. Beurteilung der Zellen	16

	Seite
2.4. Messung des Serum- und Ganzkörper-Kaliums	17
2.4.1. Kaliumbestimmung im Serum	17
2.4.2. Ganzkörperkaliumbestimmung	17
2.5. Auswertungsmethoden der experimentellen Daten	17
2.5.1. Kinetik der spezifischen Ouabain-Rezeptor-Bindung	17
2.5.2. Berechnung der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten des Ouabain-Rezeptor-Komplexes	19
2.5.3. Berechnung der Dissoziationskonstanten (K_D) und der Bindungsstellen nach Scatchard	19
2.5.4. Berechnung der Dissoziationskonstanten (K_D) und der Bindungsstellen nach Woolf	20
2.5.5. Signifikanznachweis	21
2.5.6. Streuung der experimentellen Daten	21
3. ERGEBNISSE	22
3.1. Vorversuche:	22
Vergleich der Ergebnisse verschiedener Präparationsmethoden	
3.1.1. Standardmethode	22
3.1.2. Präparation der mononukleären Leukozyten nach Defibrination des Blutes mit Glaskugeln	24
3.1.3. Reinigung der Leukozyten-Suspension mit einer Nylonsäule	26
3.1.4. Modifikationen der Präparationsmethode	27
3.2. Charakterisierung des Herzglykosidrezeptors menschlicher mononukleärer Leukozyten mit 3H -Ouabain	39

	Seite
3.2.1. Spezifische und unspezifische Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten	39
3.2.2. Zeitabhängige Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten	39
3.2.3. Geschwindigkeitskonstanten der Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten	41
3.2.4. Konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten	45
3.3. Bestimmung der Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleären Leukozyten und Messung der Dissoziationskonstanten (K_D) an einem Normalkollektiv	49
3.3.1. Aufstellung aller Messungen an Normalpersonen	49
3.3.2. Intraindividuelle Schwankung der Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleären Leukozyten von Normalpersonen	52
3.3.3. Interindividuelle Schwankung der Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleären Leukozyten von Normalpersonen	57
3.4. Messungen an Patienten mit chronischer Hypokaliämie	59
3.5. Einfluß verschiedener Diuretika auf die Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleären Leukozyten und auf die Dissoziationskonstante (K_D)	61
3.5.1. Hydrochlorothiazid	61
3.5.2. Piretanid	61

	Seite
4. DISKUSSION	67
4.1. Präparation und Charakterisierung menschlicher mononukleärer Leukozyten	67
4.2. Charakterisierung von Hormonbindungsstellen menschlicher Blutzellen	75
4.3. Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Herzglykosiden	86
4.3.1. Bindung von Herzglykosiden an Herzmuskelzellmembranen verschiedener Spezies	86
4.3.2. Bindung von Herzglykosiden an menschliche solide Gewebe	88
4.3.3. Bindung von Herzglykosiden an menschliche Erythrozyten	88
4.3.4. Bindung von Herzglykosiden an menschliche mononukleäre Leukozyten	92
4.3.5. Vergleich der Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche Blutzellen und an Herzmuskelgewebe	101
4.4. Einfluß von Kalium und von Diuretika auf die Bindung von Herzglykosiden	102
5. ZUSAMMENFASSUNG	108
6. LITERATURVERZEICHNIS	110
7. LEBENS LAUF	124

1. EINLEITUNG

Die Einführung von Radioliganden sowie die relative Einfachheit der Versuchsdurchführung hat in den letzten Jahren zu einer rapiden Zunahme von Bindungsstudien geführt. Schwierigkeiten bereitet zuweilen jedoch immer noch die Interpretation der Daten. Es stellt sich eine wichtige Frage: Welche Kriterien muß eine Bindungsstelle erfüllen, um ein Rezeptor genannt werden zu können?

In einer erst jüngst veröffentlichten Arbeit stellt Laduron (83) folgende Forderungen an eine Rezeptorbindung auf:

1. Verdrängung des Pharmakons durch Agonisten und Antagonisten verschiedener chemischer und pharmakologischer Substanzklassen.
2. Korrelation zwischen Pharmakonaffinität *in vitro* und pharmakologischer Wirksamkeit *in vivo*.
3. Örtliche Verteilung oder Gewebespezifität.
4. Subzelluläre Verteilung.
5. Stereospezifität.
6. Sättigbarkeit.
7. Reversibilität.
8. Hohe Affinität.

Motulsky und Insel (95) haben ähnliche Kriterien speziell für adrenerge Rezeptoren beschrieben. Die wohl wichtigste Voraussetzung für die Existenz eines "Rezeptors" ist, daß die Bindung an diesen Rezeptor einen physiologischen oder pharmakologischen Effekt zur Folge hat. Hochaffine Bindung eines Agonisten beweist alleine nicht das Vorhandensein eines "Rezeptors", solange kein korrelierender Effekt nachgewiesen ist. Ein Beispiel hierfür sind die D_3 -Bindungsstellen, die Dopamin mit hoher Affinität (Konzentrationen im nanomolaren Bereich) binden. Da noch keine kombinierte physiologische Wirkung gefunden werden konnte, sollten sie bisher nicht "Rezeptoren" genannt werden (32, 124).

Ein weiteres Problem besteht in der Definition der unspezifischen Bindung. Als unspezifische Bindung wird meist die Radioaktivität betrachtet, die nach Inkubation des Radioliganden und des Gewebes mit einer hohen Konzentration einer nicht markierten Substanz, die idealerweise alle spezifischen Rezeptoren besetzt, gemessen wird. Es kann nun aber zum Beispiel durch Aufnahme des radioaktiv markierten Pharmakons in intakte Zellen eine spezifische Bindung vorgetäuscht werden (90).

Herzglykoside sind oft eingesetzte Medikamente bei der Therapie der Herzinsuffizienz. Der Mechanismus der positiv inotropen Wirkung wurde häufig untersucht, ist aber noch immer nicht vollständig geklärt. 1953 zeigte Schatzmann (118), daß Herzglykoside den aktiven Kationentransport durch die Erythrozytenmembran zu hemmen vermögen. Skou (127) entdeckte 1957 in der Zellmembran von Nervenfasern ein Enzym, welches ATP spaltet sowie durch Na^+ und K^+ aktiviert wird. Ein Vergleich der Digitaliskonzentrationen, die nötig sind, um die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase verschiedener Spezies zu hemmen, sowie die gleichsinnigen Speziesunterschiede in der Digitalistoxizität führten Repke und Mitarbeiter dazu, anzunehmen, daß dieses Enzym den Herzglykosidrezeptor enthält (109, 110). Diese Hypothese ist Gegenstand mehrerer Reviews (4, 45, 99, 122). Die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase durchspannt die Zellmembran. Die Hauptaufgabe dieses Enzyms besteht in dem Transport von 2 Molekülen Kalium in die Zelle im Austausch gegen 3 Moleküle Natrium. Die dafür nötige Energie wird durch Spaltung eines Moleküls ATP an der Membraninnenseite geliefert. Die Bindungsstelle für Herzglykoside ist auf der Membranaußenseite lokalisiert. Es wird heute kaum noch bezweifelt, daß die glykosidbedingte Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase für den positiv inotropen Effekt verantwortlich ist. Die Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transports führt intrazellulär zu einem K^+ -Abfall und einer Na^+ -Akkumulation, die ihrerseits das $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Gegentransportsystem der Zellmembran aktiviert. Dadurch kommt es zu einem vermehrten Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle und dies bedingt schließlich die gesteigerte Kontraktionskraft der Herzmuskelzelle (54).

Die Ergebnisse simultaner Messungen der Ouabainbindung und der Zunahme der Kontraktionskraft von schlagenden Herzmuskelstreifen waren bei Katzen, Ratten und Meerschweinchen positiv korreliert (54). Die ^{86}Rb -Aufnahme in die Zelle, ein Maß für die Na^+/K^+ -Pumpe, wurde bei den weniger digitalisempfindlichen Spezies, Ratte und Meerschweinchen, durch positiv inotrop wirkende Ouabainkonzentrationen nicht gehemmt. An Herzmuskelzellmembranen von Ratten und Meerschweinchen bestand zwischen Bindung von Ouabain und Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ keine 1 : 1-Beziehung, wie sie bei den digitalissensitiven Spezies, Katze, Rind, Schaf und Mensch gefunden wurde. Bei diesen digitalisempfindlichen Spezies kann man also von der Messung der Ouabainbindung direkt auf die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität schließen. Diese Beziehung wurde von Hansen (71) an Rinderhirnmembranen und von Erdmann und Schoner (53) an Membranen von Rinderhirnen und -herzen und von Hundeherzen gezeigt.

Die Bindung von Ouabain an Zellmembranen führt also bei digitalissensitiven Spezies zu einem pharmakologischen Effekt, nämlich der Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$. Ouabain bindet mit hoher Affinität (Konzentrationen im nanomolaren Bereich) reversibel, zeit- und temperaturabhängig gemäß einer Sättigungskinetik an das Membranprotein (53, 48). Brown et al. (26) zeigten mit 35 verschiedenen Digitalisderivaten eine sehr gute Korrelation zwischen den durch Hemmung der Ouabainbindung bestimmten Dissoziationskonstanten und der inotropen Wirkung an schlagenden Meerschweinchenvorhöfen. Da die Bindung von Ouabain an Zellmembranen digitalisempfindlicher Spezies somit alle geforderten Kriterien erfüllt, kann die Ouabainbindungsstelle als Herzglykosidrezeptor bezeichnet werden.

Herzglykoside steigern die Kontraktionskraft des Herzens, senken die Herzfrequenz, erniedrigen die Reizleitungsgeschwindigkeit, fördern die ektope Reizbildung und führen zu verschiedenen Herzrhythmusstörungen. An extrakardialen (Neben-) Wirkungen sind Übelkeit, Erbrechen, visuelle Störungen und Verwirrheitszustände zu nennen. Hypokaliämie, zum Beispiel

durch langdauernde Diuretikagabe, steigert die Intoxikationsrate. Wegen der geringen therapeutischen Breite der Herzglykoside liegt die Nebenwirkungsrate auch heute noch bei etwa 5 - 10 % aller damit behandelten Patienten.

Es ist zwar heute möglich, den Digitalisserumspiegel zu bestimmen, jedoch besteht keine strenge Korrelation zwischen der nicht proteingebundenen Konzentration der Herzglykoside im Serum und deren Wirkungen sowie Nebenwirkungen. Besser wäre es, den an Zellmembranen gebundenen Anteil der Herzglykoside zu messen. Da sich derartige Untersuchungen am menschlichen Herzen in vivo verbieten, wurden Bindungsstudien an leichter zugänglichen Zellen, nämlich an einem Gemisch von Lymphozyten und Monozyten, die wegen ihres unsegmentierten Kerns auch als mononukleäre Leukozyten zusammengefaßt werden können (9), durchgeführt. Wenn die Glykosidrezeptoren des Herzens und diejenigen von mononukleären Leukozyten gleiche Eigenschaften aufweisen, könnte man daraus auf ein identisches Rezeptorprotein schließen. Bindungsstudien mit Herzglykosiden an menschlichen Blutzellen würden demzufolge die aktuelle Glykosidbindung am Herzen widerspiegeln. Wenn dem so ist, hätte man damit einen einfachen Test, mit dem sich eine drohende Digitalisintoxikation noch vor Auftreten klinischer Symptome erkennen ließe.

2. METHODIK

2.1. Materialien

Die Ficoll-Isopaque-Lösung ($D = 1,077 \text{ g/ml}$; Isopaque 75 % 20,0 ml, Ficoll 9,556 g, Aq. dest. 130,4 ml) für die Dichtezentrifugation erhielten wir freundlicherweise von der Apotheke der klinischen Universitätsanstalten München fertig zubereitet.

^3H -Ouabain (= ^3H -g-Strophanthin) mit einer spezifischen Radioaktivität von 16-18 Ci/mMol wurde von Fa. New England Nuclear, Dreieich, bezogen (NET-211).

Glasfaserfilter der Fa. Whatman, Kent, England (Glasfaserfilter GF/C, $\varnothing 2,5 \text{ cm}$), wurden benutzt.

Die Szintillationslösung für nichtwässriges Probenmaterial (Quickszint 501), sowie die Kunststoff-Zählfläschchen wurden von Fa. Zinsser, Frankfurt, geliefert.

Die für die Zellzählung notwendigen Materialien bekamen wir von Fa. Clinicon, Mannheim.

Die Kaliummessung wurde mit Lösungen der Fa. Eppendorf Gerätebau Netheler und Hinz, Hamburg, durchgeführt.

Esidrix^R (Hydrochlorothiazid 25 mg) wurde von Fa. CIBA-Geigy, Wehr, bezogen.

Arelix^R (Piretanid 6 mg) zur klinischen Prüfung wurde von der Fa. Cassella-Riedel, Frankfurt, zur Verfügung gestellt.

Alle anderen Chemikalien waren von analytischer Reinheit und stammten von Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt) oder Serva (Heidelberg).

2.2. Messung der Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten

2.2.1. Präparation menschlicher mononukleärer Leukozyten

Die Präparation der mononukleären Zellen wurde in Anlehnung an die Methode von Bøyum (14) durchgeführt.

Etwa 60 ml Blut wurden den Probanden (oder Patienten) aus einer leicht gestauten Armvene entnommen und mit ungefähr 500 I.E. Heparin (Heparin-Natrium, Fa. Braun, Melsungen) vermischt. Das Blut wurde anschließend 1 : 1 mit PBS ("phosphate-buffered saline") (NaCl 140 mM, Na_2HPO_4 2,4 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, 1 % Polyvinylpyrrolidon (PVP), pH 7,2, verdünnt. Bereits zuvor waren 9,5 bis 10,5 cm lange spitzkonische Reagenzgläser (Superior, Fa. Marienfeld KG, Bad Mergentheim) mit einem inneren Durchmesser von 14 mm mit circa 3 ml Ficoll-Isopaque-Lösung versetzt worden. Diese wurde nun mit dem Blut-Puffer-Gemisch mit Hilfe einer Plastikpipette zur Vermeidung größerer Adhäsion der Zellen an der Pipettenwand überschichtet. Die Röhrchen wurden dann 20 Minuten lang mit 2000 Upm (500 g) bei Zimmertemperatur in der Labofuge (Heraeus-Christ) oder in der Tischzentrifuge Rotanta/S der Fa. Hettich, Tuttlingen, zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildeten Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten einen weißen Zellring oberhalb der Trennungsflüssigkeit. Erythrozyten und Granulozyten befanden sich im Sediment am Boden des Röhrchens. Das Plasma im Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Der weiße Zellring wurde gleichfalls abgehoben und in Reagenzgläsern gesammelt. Sie wurden mit PBS-Puffer, pH 7,2, aufgefüllt und bei Zimmertemperatur 10 Minuten mit 1500 Upm (300 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde dann abgesaugt und verworfen. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Danach wurde das Zellsediment in etwa 3,5 ml Hepes-Puffer (NaCl 140 mM, Glucose 5,5 mM, Hepes 10 mM, 1 % PVP), pH 7,45, suspendiert. Während der anschließenden Leukozytenzählung mit einem Hämatologie-System der Fa. Clinicon, Mannheim, wurde die Zellsuspension in Eis aufbewahrt. Die Probe wurde dann, falls

nötig, nochmals mit Hepes-Puffer, pH 7,45, verdünnt, so daß die Lösung zwischen 15×10^6 und 30×10^6 Leukozyten pro ml enthielt. Mit demselben Zellzählgerät wurde auch stichprobenweise die Zahl der Erythrozyten in der Probe bestimmt.

2.2.2. Modifikationen der Präparationsmethode

Als Antikoagulans wurde außer Heparin auch EDTA (EDTA-Röhrchen 1,5 mg/ml Di-Kalium) verwendet.

Eine weitere Methode zur Defibrination des Blutes bestand darin, etwa 100-150 ml frisch abgenommenes venöses Blut in einem Erlenmeyer Kolben zusammen mit circa 250-300 Glaskugeln mit einem Durchmesser von 2 mm (Glasperlen, massiv, aus Soda-Kalkglas "AR", Bender & Hobein, München) für ungefähr 10 Minuten zu schütteln (16). Versuchsweise wurden etwa 2 ml Ficoll-Isopaque-Lösung mit circa 1 ml heparinisiertem Blut überschichtet. Die Röhrchen wurden danach jedoch nicht zentrifugiert, sondern, wie von Bøyum 1964 (13) angegeben, für eine gewisse Zeit stehengelassen. Während dieser Zeit agglutinieren die Erythrozyten an der Grenzschicht und die Klumpen sinken zu Boden. Da die Leukozyten nun ebenfalls langsam sedimentieren, muß der Überstand abpipettiert werden, sobald sich eine klare, etwa 3 mm breite Zone zwischen den Schichten gebildet hat. Dafür ist eine Zeit von zwischen 15 und 60 Minuten nötig. Der gewonnene Leukozytenring wurde dann weiterbehandelt wie in 2.2.1. beschrieben.

Es wurde auch eine Zelltrennung nach der modifizierten Methode von Bøyum 1976 (16) durchgeführt. Etwa 20 ml Blut wurden mit 2 ml 4,5 % EDTA-Lösung, die mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt war, versetzt. Das EDTA-Blut und 0,9 % NaCl-Lösung wurden zu gleichen Teilen gemischt. 3 ml Ficoll-Isopaque-Lösung ($D = 1,077 \text{ g/ml}$) wurden in spitzkonische Zentrifugenröhrchen mit einem inneren Durchmesser von 14 mm gegeben und mit 6 ml des Blut/NaCl-Gemisches überschichtet. Die Röhrchen wurden dann 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 2000 Upm (500 g)

zentrifugiert. Alle weiteren Schritte entsprachen den unter 2.2.1. beschriebenen, nur wurde als Waschpuffer 0,9 % NaCl-Lösung verwendet.

Die Zelltrennung mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation wurde auch mit Ficoll-Isopaque-Lösung anderer Dichte ($D = 1,072 \text{ g/ml}$ und $D = 1,083 \text{ g/ml}$) versucht.

Heparinisiertes Blut wurde 1 : 3 mit PBS-Puffer verdünnt. 4 ml Ficoll-Isopaque-Lösung ($D = 1,077 \text{ g/ml}$) wurden mit etwa 5 ml Blut/Puffer-Gemisch überschichtet und 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 2000 Upm (500 g) zentrifugiert. Der Leukozytenring wurde abgehoben. Es folgten drei Waschvorgänge mit PBS-Puffer, pH 7,2. Das Sediment wurde in etwas Hepes-Puffer, pH 7,45, suspendiert. Um nun eine reinere Lymphozytenpräparation zu erhalten, wurde eine Methode in Anlehnung an Julius (77) verwendet. Eine 20 ml Plastikspritze wurde zu etwa 6 ml mit Nylonwolle dicht gefüllt und vertikal aufgestellt. Hepes-Puffer, 20 ml, pH 7,45, wurde über die Nylonsäule gegossen. Nachdem der Puffer durchgelaufen war, wurde die Nylonwolle ausgepreßt und die Säule dann für 1 Stunde bei 37 °C in einen Wärmeschrank gestellt. Erst dann wurde die Leukozytensuspension auf die Säule aufgebracht und diese nochmals für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Nylonwolle leicht ausgedrückt und die Lösung aufgefangen. Diese wurde dann nochmals für 10 Minuten bei 1500 Upm (300 g) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml Hepes-Puffer suspendiert und die Leukozytenzahl in der Probe bestimmt.

2.2.3. Zeitabhängige Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten

In Polypropylen-Zentrifugen-Röhrchen (Fassungsvermögen 10 ml, Fa. Christ, Osterode/Harz) wurden 100 μl der Leukozyten-Suspension bei 37 °C in 150 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 3 mM ATP, 0,7 - 1,45 nM ^3H -Ouabain und 1 % PVP, pH 7,45, inkubiert. Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes 2,0 ml.

Beispiel: 0,30 ml NaCl 1 M
0,06 ml MgCl_2 0,1 M
0,06 ml ATP 0,1 M
0,50 ml 4 % PVP-Lösung
0,005 ml ^3H -Ouabain $2,8 - 5,8 \times 10^{-7}$ M
0,975 ml Aqua dest.
0,10 ml Leukozyten-Suspension

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Leukozyten-Suspension gestartet und zu den angegebenen Zeiten durch rasches Abfiltrieren über Glasfaserfilter gestoppt. Nach der in 2.2.5. beschriebenen Weiterbehandlung der Filter wurde die Radioaktivität gemessen.

2.2.4. Konzentrationsabhängige Bindung

100 μl Leukozyten-Suspension wurden in Polypropylen-Zentrifugen-Röhrchen bei 37 °C in 150 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 3 mM ATP, 0,7 bis 1,45 nM ^3H -Ouabain und 1 % PVP, pH 7,45, mit steigenden Konzentrationen (1×10^{-9} bis $1,5 \times 10^{-8}$ M) nicht radioaktiv markierten Ouabains inkubiert. Während der Inkubation wurden die Röhrchen mehrfach geschüttelt. Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes 2,0 ml.

Beispiel: 0,30 ml NaCl 1 M
0,06 ml MgCl_2 0,1 M
0,06 ml ATP 0,1 M
0,50 ml 4 % PVP-Lösung
0,005 ml ^3H -Ouabain $2,8 - 5,8 \times 10^{-7}$ M
0,10 ml Ouabain 10^{-7} M
0,875 ml Aqua dest.
0,10 ml Leukozyten-Suspension

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Leukozyten-Suspension gestartet und nach Ablauf der erforderlichen Inkubationszeit durch rasches Abfiltrieren über Glasfaserfilter gestoppt. Die für menschliche Leukozyten erforderliche Inkubationszeit wurde

zuvor durch eine zeitabhängige Bindung von ^3H -Ouabain an Leukozyten ermittelt (2.2.3., 3.2.2.). Die Filter wurden, wie in 2.2.5. beschrieben, weiterbehandelt; anschließend die Radioaktivität auf den Filtern gemessen.

Versuchsweise wurden 100 μl Leukozyten-Suspension, die wie in 2.2.1. beschrieben gewonnen wurde, in 150 mM NaCl, 5,5 mM Glucose, 10 mM Hepes, pH 7,45 und 1,45 nM ^3H -Ouabain inkubiert. Es wurden auch unspezifische Werte und Maximalwerte erhoben. Die Proben wurden, wie in 2.2.5. angegeben, weiterbehandelt und die Radioaktivität gemessen.

2.2.5. Aufbereitung der Proben und Meßverfahren

Nach erfolgter Inkubation kann das membrangebundene Ouabain vom freien durch schnelles Abfiltrieren leicht getrennt werden. Die Reaktion wurde gestoppt durch Vollfüllen des Reaktionsgefäßes mit eiskaltem destillierten Wasser und rasches Abfiltrieren über eine Filtrationsanlage der Fa. Sartorius, Göttingen. Durch den mit einer Wasserstrahlpumpe erzeugten Unterdruck wurde das Inkubationsmedium von den Zellen, welche auf dem Glasfaserfilter (GF/C, Durchmesser 2,5 cm, Fa. Whatman) haften blieben, getrennt. Um keine Probenreste zu verwerfen, wurde das Reaktionsgefäß nochmals mit 10 ml destilliertem Wasser gefüllt und über den Filter entleert. Die Filter eines Versuches wurden auf einer Glasplatte gesammelt und in einem Wärmeschrank 15 Minuten bei 100 °C getrocknet. Anschließend wurden sie mit einer Pinzette in Zählröhrchen gelegt und mit je 10 ml Szintillationslösung übergossen. Die auf den Filtern gebundene Radioaktivität wurde mit einem Szintillationszählgerät (Packard Tri-carb 2660 oder BF Beta-szint 5000) in "Counts per minute" (cpm) gemessen.

2.2.6. Bestimmung des im Inkubationsmedium maximal vorhandenen ^3H -Ouabains

Bei jedem Versuch wurden auch Proben inkubiert und filtriert, die nur Aqua dest., PVP-Lösung und dieselbe Menge Leukozyten-Suspension wie für die Bindungsreaktion enthielten. Nach Trocknen der Filter bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde mit einer Eppendorfpipette $1/50$ der Menge des im Bindungsexperiment pro Röhrchen verwendeten Reaktionsansatzes darauf verteilt. Die Filter wurden nun nochmals 15 Minuten bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet und dann in Szintillationsröhrchen gelegt. Die Röhrchen wurden mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllt und in einem Szintillationszählgerät gemessen. Die Radioaktivität wurde mit dem Faktor 50 multipliziert und ergibt die pro Reaktionsgefäß eingesetzten cpm. Die Maximalwerte wurden wie alle anderen Werte jeweils in Dreifachbestimmungen angesetzt und das Ergebnis gemittelt.

2.2.7. Definition der unspezifischen Bindung

Bei jedem Bindungsexperiment wurden auch Proben gemessen, die unter sonst gleichen Bedingungen nicht radioaktiv markiertes Ouabain im Überschuß ($5 \times 10^{-4}\text{ M}$) enthielten. Es konnte also erwartet werden, daß praktisch kein ^3H -Ouabainmolekül an den membrangebundenen Herzglykosidrezeptor spezifisch gebunden war. Die trotzdem gemessene Radioaktivität ist folglich ein Maß für die unspezifische Bindung von ^3H -Ouabain an Glasfaserfilter oder Zellmembranen. Die unspezifische Bindung betrug regelmäßig weniger als 10 % der Gesamtbindung. Die für die unspezifische Bindung ermittelten "cpm" wurden von allen übrigen Werten subtrahiert. Auch diese Messungen wurden wie alle anderen in Dreifachwerten bestimmt und das Ergebnis gemittelt. Eine andere Methode, die unspezifische Bindung zu messen, wurde verwendet, wobei die für die unspezifische Bindung notwendigen Liganden (Na^+ , Mg^{2+} , ATP) im Inkubationsmedium weggelassen wurden. Dabei wurden praktisch gleiche Ergebnisse erhalten.

2.2.8. Messung der Assoziation des ^3H -Ouabain-Rezeptor-Komplexes

In Polypropylen-Zentrifugen-Röhrchen wurde eine 150 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 3 mM ATP, 2,75 nM ^3H -Ouabain und 1 % PVP enthaltende Lösung, pH 7,45, für 10 Minuten vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μl Leukozyten-Suspension gestartet. Das Endvolumen betrug 2 ml und enthielt $1,5 - 2,0 \times 10^6$ mononukleäre Zellen pro ml. Nach einer Inkubationszeit von 0 bis 6 Minuten wurden die Proben gefiltert. Alles weitere erfolgte wie unter 2.2.5. beschrieben. Diejenige gebundene Radioaktivität, die man erhielt, wenn man die Probe nach Zugabe der Zellen sofort filterte, wurde als Maß für die unspezifische Bindung betrachtet und von allen anderen Werten subtrahiert. Alle Meßwerte wurden in zweifacher Ausführung ermittelt.

2.2.9. Messung der Dissoziation des ^3H -Ouabain-Rezeptor-Komplexes

Für die Messung der Dissoziation mußten einem Probanden 100 ml Blut abgenommen werden (Präparation s. 2.2.1.). Um eine ausreichende Menge an ^3H -Ouabain-Rezeptor-Komplex isolieren zu können, wurden $115 - 145 \times 10^6$ mononukleäre Zellen für 5 Stunden in 150 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 3 mM ATP, 27,5 nM ^3H -Ouabain und 1 % PVP, pH 7,45, bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes 6 ml.

0,46 ml NaCl 1 M
0,18 ml MgCl_2 0,1 M
0,18 ml ATP 0,1 M
1,50 ml 4 % PVP-Lösung
0,30 ml ^3H -Ouabain $0,55 \times 10^{-6}$ M
0,68 ml Aqua dest.
2,70 ml Leukozyten-Suspension

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch 10minütiges Zentrifugieren bei 1500 Upm (300 g) gestoppt. Der

das nicht gebundene ^3H -Ouabain enthaltende Überstand wurde abpipettiert, das Sediment in 3 ml Hepes-Puffer, pH 7,45, suspendiert.

Zur Messung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten wurden nun jeweils 100 μl des ^3H -Ouabain-Rezeptor-Komplexes in 150 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 3 mM ATP, 1 % PVP und 5×10^{-4} M nicht radioaktiv markierten Ouabains, pH 7,45, bei 37 °C inkubiert. Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes 2 ml.

0,30 ml NaCl 1 M
0,06 ml MgCl_2 0,1 M
0,06 ml ATP 0,1 M
0,50 ml 4 % PVP-Lösung
0,10 ml Ouabain 10^{-2} M
0,88 ml Aqua dest.
0,10 ml ^3H -Ouabain-Rezeptor-Komplex

Die Verdrängung des ^3H -Ouabains von seinem Rezeptor durch das nicht markierte Ouabain wurde zu den angegebenen Zeiten durch Auffüllen des Reaktionsgefäßes mit eisgekühltem Wasser und rasches Abfiltrieren über Whatman Glasfaserfilter GF/C gestoppt. Das noch membrangebundene ^3H -Ouabain blieb also auf den Filtern haften. Diese wurden, wie in 2.2.5. beschrieben, weiterbehandelt. Um einen Wert für das maximal gebundene ^3H -Ouabain zu erhalten, wurde dieselbe Menge an ^3H -Ouabain-Rezeptor-Komplex dem auf 37 °C vorgewärmten Inkubationsmedium zugegeben und sofort filtriert. Als Maß für die unspezifische Bindung von ^3H -Ouabain an die Zellmembran wurde diejenige Radioaktivität betrachtet, die nach 12ständiger Inkubation noch zu messen war. Nach dieser Zeit kann man erwarten, daß an allen spezifischen Bindungsstellen eine Verdrängung des ^3H -Ouabains durch nicht markiertes Ouabain erfolgt ist. Der für die unspezifische Bindung ermittelte Wert wurde von allen anderen Meßwerten subtrahiert.

2.3. Differenzierung der Zellsuspension und Beurteilung der Vitalität der Zellen

2.3.1. Aufbringen der Zellen auf Objektträger

Bei allen Bindungsstudien wurden die Zellen nach erfolgter Präparation auf saubere, fettfreie Objektträger zentrifugiert, gefärbt und differenziert. 100 µl Serum wurden in einer Zytocentrifuge (Shandon, Elliot, Cytospin) 5 Minuten mit 600 Upm zentrifugiert. Dann wurden 100 µl der etwa zehnfach mit HEPES-Puffer, pH 7,45, weiterverdünnten Leukozyten-Suspension zugegeben und nochmals 10 Minuten mit 400 Upm zentrifugiert. Für die Ausbeutebestimmungen wurden außerdem Blutaussstriche angefertigt.

2.3.2. Färbung nach Pappenheim

Die durch die Zytozentrifugation gewonnenen Präparate wurden nach Lufttrocknung für 6 Minuten in May-Grünwald-Lösung getaucht. Danach wurden die Objektträger kurz in Aqua bidest. geschwenkt und kamen dann für 20 Minuten in Giemsa-Gebrauchslösung (Giemsa-Stammlösung 1 : 25 mit Aqua bidest. verdünnt). Anschließend wurden sie mit Aqua bidest. abgespült und an der Luft getrocknet.

Die Blutaussstriche wurden wie folgt gefärbt:

Die Ausstriche wurden waagrecht auf die Färbepalette gelegt und zur Fixierung für 3 Minuten mit konzentrierter May-Grünwald-Lösung bedeckt. Dann wurde etwa dieselbe Menge Aqua bidest. zugegeben und mit der May-Grünwald-Lösung vermischt. Nach einer Minute wurde die Lösung abgekippt. Anschließend wurden die Objektträger 20 Minuten mit Giemsa-Gebrauchslösung (Giemsa-Stammlösung 1 : 20 mit Aqua bidest. verdünnt) gefärbt. Danach wurde die Färbelösung von der Seite her kräftig mit Aqua bidest. abgespült und die Ausstriche schräg zum Trocknen aufgestellt. Die Unterseite der Objektträger wurde mit Aethanol von Farbniederschlägen gereinigt.

2.3.3. Thrombozytenzählung

Die Bestimmung der Thrombozytenzahl in der Leukozyten-Suspension erfolgte in etwas abgewandelter Art nach der Methode von Fonio. Ein Teil der Probe wurde, wie unter 2.3.1. beschrieben, auf Objektträger zentrifugiert. Das Präparat wurde dann nach Pappenheim gefärbt (s. 2.3.2.), aber anstatt 20 Minuten für 40 - 60 Minuten in der Giemsa-Lösung belassen. An einer repräsentativen Stelle des Präparates wurden (mit Hilfe eines Ölimmersionsobjektivs) die Thrombozyten pro 1000 Leukozyten ausgezählt. Da die Leukozytenzahl in der Probe bekannt war (s. 2.2.1.), konnte die Thrombozytenzahl wie folgt bestimmt werden:

$$\frac{\text{o/oo Thrombozyten} \times \text{Leukozytenzahl/mm}^3}{1000} = \text{Thrombozyten/mm}^3$$

2.3.4. Naphthol-AS-Acetate-Esterase-Färbung

Die Differenzierung der Zellen wurde auch mit Hilfe der Azofarbstoffmethode nach Löffler (88) durchgeführt. Die Methode beruht auf der hydrolytischen Spaltung eines Arylestere und der sofortigen Kupplung des freigesetzten Phenols mit einem Diazoniumsalz, wobei ein wasserunlöslicher Farbstoff entsteht.

Die durch Zytozentrifugation gewonnenen, luftgetrockneten Präparate wurden 5 Minuten in Formalindampf (35 - 37 % Formalin) fixiert und danach 1 - 2 Minuten gewässert. Nach Lufttrocknung erfolgte eine 70minütige Inkubation bei Zimmertemperatur in folgender, filtrierter Lösung:

80,0 ml Phosphatpuffer nach Sörensen, 0,1 M, pH 6,8 - 7,0

1,6 ml Propylenglykol

1,5 ml Substratlösung (N-AS-Acetate 10,6 mg gelöst in 2,0 ml Aceton)

160 mg Echtblausalz BB e. K.

Phosphatpuffer nach Sörensen 0,1 M, pH 6,8 - 7,0:

60 ml Na_2HPO_4 0,1 M

40 ml KH_2PO_4 0,1 M

Anschließend wurden die Objektträger 1 - 2 Minuten gewässert und erneut luftgetrocknet.

Als Gegenfärbung wurde die Kernfärbung nach Feulgen verwendet: Nach 10minütiger Hydrolyse in 1 M HCl bei 60 °C wurden die Präparate 2 x 2 Minuten in Aqua dest. gewässert, danach 30 Minuten in Schiff's Reagens nach Graumann gefärbt und dann 3 x 2 Minuten in frisch bereitetem SO_2 -Wasser gewässert:

15 ml 10 % Kaliummetabisulfit

15 ml 1 M HCl

270 ml Aqua dest.

Nun wurden die Objektträger nochmals 10 Minuten mit Aqua dest. gewässert. Erst als die Präparate ganz trocken waren, wurden sie in Kaisers Glyceringelatine eingebettet.

2.3.5. Beurteilung der Zellen

Die Zellzahl in der Leukozytensuspension wurde auch mit der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Es wurden Proben ungefärbt und gefärbt mit Kristallviolett ausgezählt.

100 μl Leukozyten-Suspension wurden unter identischen Bedingungen wie bei den Bindungsversuchen allerdings ohne ^3H -Ouabain für 5 Stunden inkubiert. Dann wurde aus dem Inkubationsmedium eine Probe entnommen, auf Objektträger zentrifugiert und nach Pappenheim (s. 2.3.2.) gefärbt. Die Zellen wurden anschließend unter dem Mikroskop betrachtet und nach ihrer Form beurteilt.

2.4. Messung des Serum- und Ganzkörper-Kaliums

2.4.1. Kaliumbestimmung im Serum

Etwa 1 ml frisch abgenommenes Blut wurde in ein Eppendorfreaktionsgefäß (Polypropylen) gegeben und sofort für 2 Minuten in einer Eppendorf Zentrifuge 3200 zentrifugiert. Mit einem Flammenphotometer (Fa. Eppendorf Gerätebau Netheler und Hinz, Hamburg) wurde die Konzentration an Kalium im Überstand gemessen.

2.4.2. Ganzkörperkaliumbestimmung

Das auf der Erde vorkommende Kalium liegt zu 0,012 % als natürlich radioaktives Isotop ^{40}K vor, welches mit einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ von $1,3 \times 10^9$ Jahren zerfällt. Das Gesamtkalium im menschlichen Körper (etwa 150 g) enthält demnach eine Aktivität von circa 10 nCi. In 11 % aller K^+ -Zerfälle wird ein Gammaquant mit 1,460 MeV ausgesandt. Daher war es möglich, das Gesamtkörperkalium von Probanden mittels eines "Low level" Ganzkörperzählers (Fa. Frieseke und Hoepfner) zu messen. Dabei wurde der gesamte Meßraum mit 150 mm aktivitätsarmem Eisen und 10 mm Blei gegen die natürliche Umgebungsstrahlung abgeschirmt. Als Sonden wurden 4 Natrium-Jodid (NaJ) Szintillationsdetektoren der Größe 5 Zoll Durchmesser und 4 Zoll Dicke verwendet. Die Signale der Sonden wurden in einem Vielkanalanalysator nach Energien sorbiert. Der Untergrund im gewählten ^{40}K -Fenster betrug 0,4 Ereignisse/Sekunde je Detektor.

2.5. Auswertungsmethoden der experimentellen Daten

2.5.1. Kinetik der spezifischen Ouabain-Rezeptor-Bindung

Die Wechselwirkungen zwischen einem Rezeptor und einem Pharmakon folgen dem Massenwirkungsgesetz (28).

Das gilt auch für die Bindung von Ouabain an seinen Rezeptor (45, 70).



R = Rezeptor

Ou = Ouabain (Substrat)

OuR = Ouabain-Rezeptor-Komplex (Substrat-Rezeptor-Komplex)

Aus dieser Gleichung folgt, daß die Wirkung von Ouabain direkt proportional der Anzahl der von ihm besetzten Rezeptoren ist. Wieviele Rezeptoren besetzt sind, hängt von den Konzentrationen an Ouabain und Rezeptor und den jeweiligen Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten ab. Im Äquilibrium bleibt die Zahl der Ouabain-Rezeptor-Komplexe konstant, da pro Zeiteinheit ebensoviele Ouabain-Rezeptor-Komplexe gebildet werden wie wieder zerfallen. Unter Gleichgewichtsbedingungen gilt also:

$$[\text{R}] \cdot [\text{Ou}] \cdot k_{+1} = [\text{OuR}] \cdot k_{-1}$$

$$\frac{[\text{R}] \cdot [\text{Ou}]}{[\text{OuR}]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_D \quad (\text{Gleichung 2})$$

[R] = molare Rezeptorkonzentration

[Ou] = molare Ouabainkonzentration

[OuR] = molare Konzentration des Ouabain-Rezeptor-Komplexes

k_{+1} = Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

k_{-1} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

K_D = Dissoziationskonstante des Ouabain-Rezeptor-Komplexes

Aus Gleichung (2) wird ersichtlich, daß die Dissoziationskonstante des Ouabain-Rezeptor-Komplexes als reziprokes Maß für die Affinität des Herzglykosidrezeptors zu Ouabain gelten kann; also je kleiner die Dissoziationskonstante (K_D) ist, desto größer ist die Affinität des Rezeptors zu Ouabain.

2.5.2. Berechnung der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten des Ouabain-Rezeptor-Komplexes

Gemäß der Gleichung (2) (2.5.1.) kann die Dissoziationskonstante (K_D) des Ouabain-Rezeptor-Komplexes aus der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten berechnet werden. Die Bildung des Ouabain-Rezeptor-Komplexes ist ein zeit- und temperaturabhängiger Prozeß 2. Ordnung (53). Sind die Ouabain- und Rezeptorkonzentrationen zu Beginn der Reaktion bekannt, kann man die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} einer Gleichung 2. Ordnung berechnen:

$$k_{+1} = \frac{1}{(a - b) \cdot t} \cdot \ln \frac{b \cdot (a - x)}{a \cdot (b - x)} \quad \text{M}^{-1}\text{sec}^{-1} \quad (\text{Gleichung 3})$$

a = Ouabain-Anfangskonzentration (Substratkonzentration)

b = Anfangskonzentration des freien Rezeptors

x = Menge des Ouabain-Rezeptor-Komplexes zur Zeit t

Die Dissoziation des Ouabain-Rezeptor-Komplexes ist ebenfalls ein zeit- und temperaturabhängiger Vorgang, jedoch ein Prozeß 1. Ordnung (53). Man erhält also bei halblogarithmischer Auftragung des gebundenen ^3H -Ouabains gegen die Zeit eine Gerade. Zur Zeit t ist die Hälfte des anfänglichen ^3H -Ouabain-Rezeptor-Komplexes dissoziiert. Daraus läßt sich die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} berechnen.

2.5.3. Berechnung der Dissoziationskonstanten (K_D) und der Bindungsstellen nach Scatchard

Scatchard (116) hat folgende Linearisierung der Michaelis-Menten-Gleichung angegeben:

$$B/F = (B_{\text{max}}/K_D) + (-1/K_D) B \quad (\text{Gleichung 4})$$

Durch Multiplikation der Gleichung mit K_D und Umformen erhält man folgende Gleichung:

$$B = B_{\max} - K_D \cdot B/F \quad (\text{Gleichung 5})$$

Die experimentellen Daten der konzentrationsabhängigen Bindung wurden entsprechend dieser Gleichung (B gegen B/F) aufgetragen. Welche Kurve den Meßpunkten am besten entsprach, wurde durch lineare Regression ("least squares linear regression") ermittelt. Man erhält bei dieser Auftragung eine Gerade, falls die Affinität der Rezeptoren für Ouabain von der Ouabain-Konzentration unabhängig ist und somit nur ein Rezeptortyp vorhanden ist. Ist diese Voraussetzung erfüllt, ergibt sich die maximale, extrapolierte Bindungskapazität für Ouabain aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate ($B_{\max}$). Die Dissoziationskonstante (K_D) des Ouabain-Rezeptor-Komplexes, also diejenige Konzentration an freiem Ouabain, bei der die Hälfte der Rezeptoren besetzt ist, entspricht dann dem negativen Wert der Steigung der Geraden. Die Zahl der Bindungsstellen für Ouabain pro mononukleäre Zelle kann folgendermaßen berechnet werden:

$$\text{Rezeptoren pro Zelle} = \frac{B_{\max} \text{ (mole)} \cdot \text{Loschmidt'sche Zahl}}{\text{Zellzahl pro Röhrchen}}$$

2.5.4. Berechnung der Dissoziationskonstanten (K_D) und der Bindungsstellen nach Woolf

Eine andere Linearisierung der Michaelis-Menten-Gleichung wurde von Woolf (80) angegeben:

$$F/B = (K_D/B_{\max}) + (1/B_{\max}) F \quad (\text{Gleichung 6})$$

Trägt man die Ergebnisse der konzentrationsabhängigen Bindungsexperimente mit F/B gegen F auf, erhält man auch bei dieser Art der Darstellung eine Gerade, wenn nur ein Rezeptor-

typ vorliegt (vgl. 2.5.3.). Die Steigung der Geraden entspricht dann $1/B_{\max}$. Der Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse ergibt den Quotienten K_D durch $B_{\max}$. Die Anzahl Bindungsstellen pro Zelle kann, wie unter 2.5.3. beschrieben, berechnet werden. Um den Verlauf der Kurve zu bestimmen, wurde eine "unweighted robust regression analysis" (33) verwendet.

2.5.5. Signifikanznachweis

Um herauszufinden, ob sich zwei Kollektive signifikant voneinander unterscheiden, wurde ein T-Test zur Prüfung verbundener Stichproben angewendet. Als Kriterium für statistische Signifikanz wurde ein p-Wert kleiner 0,05 betrachtet.

2.5.6. Streuung der experimentellen Daten

In dieser Arbeit werden bei mehr als zwei voneinander unabhängigen Messungen die Ergebnisse, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (s) angeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Vorversuche:

Vergleich der Ergebnisse verschiedener Präparationsmethoden

3.1.1. Standardmethode

Für die meisten Versuche wurden die Zellen nach der unter 2.2.1. beschriebenen Methode präpariert. Man erhielt damit ein Zellgemisch aus Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten.

Die Zahl der Erythrozyten in der Zellsuspension wurde stichprobenweise bestimmt (2.2.1.): 230 ± 125 Erythrozyten pro 100 Leukozyten. Auch die Zahl der Thrombozyten in der Probe wurde ermittelt. Sie betrug $23,6 \pm 10,4 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($n = 10$).

Es wurde jedesmal ein Teil der Probe auf Objektträger zentrifugiert (2.3.1.). Die Präparate wurden nach Pappenheim gefärbt (2.3.2.) und nur die Leukozyten bezogen auf 100 Leukozyten nach Zellart differenziert. Für das Normalkollektiv (34 Personen, 133 Messungen) ergaben sich folgende Werte (in %):

Lymphozyten:	76 ± 12
Monozyten:	22 ± 12
Neutrophile Granulozyten:	0 - 3
Basophile Granulozyten:	0 - 3
Eosinophile Granulozyten:	0 - 2

Als Kontrolle wurde stichprobenweise eine spezielle Färbung, die Naphthol-AS-Acetat-Esterase-Färbung (2.3.4.), durchgeführt. Diese Färbung basiert auf der Fähigkeit mancher Zellen, einen Arylester hydrolytisch zu spalten und das freigesetzte Phenol sofort mit einem Diazoniumsalz zu koppeln. Am Ort der Enzymaktivität entsteht ein feinkörniger blauer, wasserunlöslicher Azofarbstoff. Erythrozyten, Thrombozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten lassen nur eine sehr schwache, basophile Granulozyten eine etwas stärkere Esteraseaktivität

erkennen. Im Zytoplasma der Lymphozyten finden sich nur wenige Körnchen. Die Zelle mit der stärksten Naphthol-AS-Acetat-Esteraseaktivität im peripheren Blut ist der Monozyt. Durch diese Spezialfärbung lassen sich also Lymphozyten und Monozyten gut voneinander unterscheiden. Die Ergebnisse der Zelldifferenzierungen derselben Probe eines Pappenheim-Präparates und eines Naphthol-AS-Acetat-Präparates (n = 26) stimmten im Rahmen der experimentellen Fehlerbreite überein (in %):

	Lymphozyten	Monozyten
Pappenheim-Färbung	72 $\pm$ 9	25 $\pm$ 8
Esterase-Färbung	73 $\pm$ 9	26 $\pm$ 9
T-Wert	1,11	1,38
Signifikanzniveau (p)	0,28	0,18

Um die Ausbeute an Leukozyten der Präparationsmethode zu bestimmen, ist es nötig, die Zellen sowohl im Blut als auch in der Probe zu differenzieren. Es wurden Blutausrichtheilungen angefertigt (s. 2.3.1. und 2.3.2.) und die Leukozytenzahl pro μ l Blut gemessen. Aus den Prozentzahlen für die einzelnen Zellarten, der Leukozytenzahl und dem für die Präparation verwendeten Blutvolumen wurden die Absolutzahlen der eingesetzten Zellen jeden Typs berechnet. Nach der Präparation der Zellen wurde ein Teil der Zellsuspension auf Objektträger zentrifugiert und ebenfalls differenziert. Nun konnten, da Volumen und Leukozytenzahl der Probe gleichfalls bekannt waren, die absoluten Zahlen der einzelnen Zellarten in der Probe errechnet werden. Aus dem Vergleich der Absolutzahlen im Blut und in der Probe ergab sich folgende Ausbeute (in %):

Lymphozyten:	46 $\pm$ 16 (n = 15)
Monozyten:	87 $\pm$ 36 (n = 15)
Neutrophile Granulozyten:	0,16 $\pm$ 0,14 (n = 15)

Für die basophilen und eosinophilen Granulozyten ließen sich keine Ausbeutebestimmungen erstellen, da sie sowohl im Blut als auch in der Probe in zu geringen Zahlen vorkamen.

Die mikroskopische Differenzierung der Zellen ermöglichte eine Beurteilung derselben. Sie schienen größtenteils morphologisch intakt, nur vereinzelt fanden sich Zellschatten, was vielleicht aber auch auf die Zytozentrifugation zurückzuführen ist.

Die Vitalität der Zellen wurde durch eine Kristallviolett-färbung (s. 2.3.5.) überprüft.

Leukozytenzählung mit Neubauer-Zählkammer:

ungefärbt:	5300	7800	15500
Kristallviolett:	3300	4300	11200
% vitale Zellen:	62	55	72 $\bar{x} \pm s = 63 \pm 8,5$

Bei einer mikroskopischen Betrachtung der Zellen nach 5 Stunden Inkubation (s. 2.3.5.) schienen diese nach wie vor morphologisch intakt, nur das Zytoplasma einiger Zellen enthielt Vakuolen.

3.1.2. Präparation der mononukleären Leukozyten nach Defibrination des Blutes mit Glaskugeln

Durch die Defibrination des Blutes mit Glaskugeln (s. 2.2.2.) erhielt man nach erfolgter Präparation eine Zellsuspension, die sich in ihrer Zellzusammensetzung deutlich von der unter Verwendung von Heparin gewonnenen Probe unterschied. In den durch Zytozentrifugation erhaltenen Präparaten sah man keine Thrombozyten, aber erheblich mehr Erythrozyten. Der Anteil der Lymphozyten bezogen auf 100 Leukozyten war im Durchschnitt etwas höher (in %, n = 11):

Lymphozyten:	82 $\pm$ 9
Monozyten:	15 $\pm$ 8
Neutrophile Granulozyten:	0 - 1
Basophile Granulozyten:	0 - 3
Eosinophile Granulozyten:	0 - 1

Die Präparation der Zellen nach Defibrination des Blutes mit Glaskugeln beinhaltete aber einen großen Nachteil, nämlich eine äußerst geringe Zellausbeute. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse von zwei Versuchen mit Blut derselben Versuchsperson. Es wird deutlich, daß unter Verwendung von Glaskugeln die doppelte Menge Blut nötig war, um etwa dieselbe Anzahl Zellen in der Probe zu erhalten. Der Vergleich der Zahlen für die maximale Bindungskapazität und für die Bindungsstellen pro Zelle zeigt, daß bei dieser Methode nicht nur die Zellausbeute, sondern auch das Bindungsverhalten der Zellen geringer war. Allerdings liegen die Werte sowohl für die Bindungsstellen pro Zelle als auch für die Dissoziationskonstante (K_D) im Normbereich.

Tabelle 1: Bindung von ^3H -Ouabain an mononukleäre Leukozyten

	verwen- detes Blut- volumen	Leuko- zyten pro 100 μl	max. Bin- dungskapa- zität (Mole pro 100 μl Zellen)	Bin- dungs- stel- len pro Zelle	K_D (M)
Heparin-Blut:	60 ml	$15,3 \times 10^5$	$0,094 \times 10^{-12}$	37000	$3,9 \times 10^{-9}$
Defibrin.-Blut:	150 ml	$14,5 \times 10^5$	$0,061 \times 10^{-12}$	25400	$1,6 \times 10^{-9}$

Die in der Tabelle 1 gezeigten Versuche wurden nicht am selben Tag durchgeführt. Man könnte nun anmerken, daß sich die Zellzusammensetzung und die Rezeptorenzahl im Laufe von zwei Wochen geändert haben könnten. Dagegen sprechen jedoch weitere vergleichende Studien, die zu denselben Schlußfolgerungen führen. Am gleichen Tag wurden 20 ml heparinisiertes Blut (Probe 1) und 30 ml Blut, welches durch Glaskugeln defibriert wurde (Probe 2), unter identischen Bedingungen, wie in 2.2.1. beschrieben, präpariert. Das Zellsediment beider Proben wurde in je 1,5 ml Hepes-Puffer, pH 7,45, suspendiert und die Leukozytenzahl gemessen. Probe 1 enthielt $17,0 \times 10^3$ Zellen pro μl . Probe 2 dagegen nur $13,2 \times 10^3$ Zellen pro μl . Probe 1 wurde dann auf dieselbe Zellzahl wie in Probe 2 herunterverdünnt. 100 μl von jeder Zellsuspension wurden für 5 Stunden

bei 37 °C in 150 mM NaCl, 5,5 mM Glucose, 10 mM Hepes und $2,9 \times 10^{-9}$ M ^3H -Ouabain, pH 7,45, (s. 3.1.4.) inkubiert. Danach wurden die Proben, wie in 2.2.5. beschrieben, weiterbehandelt und die gebundene Radioaktivität gemessen. Für Probe 1 erhielt man 667 cpm, Probe 2 hatte 357 cpm gebunden. Interessant war auch das Ergebnis der Differenzierung der beiden Proben (in %):

	Lymphozyten	Monozyten	Neutrophile Granulozyten	Eosinophile Granulozyten
Heparin:	59	39	1	1
Glaskugeln:	83	16	1	

Eine Auswertung der Bindungsstudien ist nur möglich, wenn genügend Radioaktivität gebunden ist. Um diese Forderung zu erfüllen, hätte man mit der Glaskugelmethode jeweils etwa 150 ml Blut einsetzen müssen. Da dies insbesondere bei Verlaufsstudien nicht zu vertreten ist, mußte auf diese Präparationsart trotz der reineren Zellsuspension verzichtet werden.

3.1.3. Reinigung der Leukozyten-Suspension mit einer Nylonsäule

Es wurde versucht, mit Hilfe einer Nylonsäule (s. 2.2.2.) eine reinere Lymphozytensuspension zu bekommen. Die Monozyten und ein Großteil der B-Lymphozyten haften an der Nylonwolle, wohingegen insbesondere die T-Lymphozyten mit dem Puffer durchgespült werden (s. (77)). Nach Dichtezentrifugation des Blutes mit einer Ficoll-Isopaque-Lösung ($D = 1,077 \text{ g/ml}$), drei Waschvorgängen mit PBS-Puffer, pH 7,2, und Suspension des Sedimentes in Hepes-Puffer, pH 7,45, wurde die erhaltene Zelllösung über eine Nylonsäule laufen gelassen. Das Eluat wurde aufgefangen und abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1 ml Hepes-Puffer, pH 7,45, suspendiert und die Leukozytenzahl in der Probe bestimmt. Es konnten nur $2,2 \times 10^3$ Zellen pro μl gewonnen werden, obwohl 60 ml Blut verwendet worden waren, eine Blutmenge, die, nach der in 2.2.1. beschriebenen

Methode präpariert, in 3,5 ml Volumen etwa 3×10^4 Zellen pro μl ergeben hätte. 1 ml Probe mit $2,2 \times 10^3$ Zellen pro μl reicht nicht aus, um Bindungsstudien mit Ouabain durchführen zu können. Wegen der geringen Ausbeute und da man auf den durch Zytozentrifugation der Probe erhaltenen Präparaten fast nur Zellschatten und Zellfragmente sah, wurde diese Methode nicht weiter verwendet.

3.1.4. Modifikationen der Präparationsmethode

Als Antikoagulans wurde anstatt Heparin auch EDTA ausprobiert (2.2.2.). Viermal wurde ein konzentrationsabhängiges Bindungsexperiment mit ^3H -Ouabain an menschlichen mononukleären Leukozyten, die aus mit EDTA versetztem Blut gewonnen wurden, durchgeführt. Die Probe enthielt zu $73 \pm 4 \%$ Lymphozyten, zu $26 \pm 4 \%$ Monozyten und zu 0 - 2 % basophile Granulozyten. Pro Zelle errechneten sich 30100 ± 4000 Bindungsstellen für Ouabain, die Dissoziationskonstante (K_D) betrug $2,4 \pm 0,5 \times 10^{-9}$ M. Alle diese Werte liegen in dem Bereich, den die Messungen an Normalpersonen mit heparinisiertem Blut ergaben. Daß die Verwendung von EDTA anstatt Heparin zu den im Rahmen der experimentellen Fehlerbreite gleichen Ergebnissen führt, wird besonders deutlich aus dem direkten Vergleich von Versuchen mit heparinisiertem Blut und EDTA-Blut derselben Person (s. Tabelle 2). Da also die Benutzung von EDTA keinen Vorteil brachte, wurde weiter Heparin verwendet.

Tabelle 2: Daten zweier konzentrationsabhängiger Bindungsexperimente mit ^3H -Ouabain an mononukleären Leukozyten derselben Versuchsperson

	verwen- detes Blut- volumen	Leuko- zyten pro 100 μl	maximale Bindungs- kapazität (Mole pro 100 μl Zellen)	Bin- dungs- stel- len pro Zelle	K_D (M)
Heparin-Blut:	30 ml	$12,3 \times 10^5$	$0,065 \times 10^{-12}$	31800	$2,5 \times 10^{-9}$
EDTA-Blut:	30 ml	$12,0 \times 10^5$	$0,052 \times 10^{-12}$	26100	$1,8 \times 10^{-9}$

	% Lymphozyten	Monozyten	Basophile Granulozyten
Heparin-Blut:	70	27	3
EDTA-Blut:	77	21	2

Ein Vergleich von Präparationsergebnissen unter Verwendung von Ficoll-Isopaque-Lösungen verschiedener Dichte wurde durchgeführt. Je zweimal wurden 10 ml Blut derselben Person mit Hilfe von Ficoll-Isopaque-Lösungen der Dichte 1,072 (Proben 1 und 2), 1,077 (Proben 3 und 4) und 1,083 (Proben 5 und 6), sonst wie in 2.2.1. angegeben, präpariert. Das Zellsediment jeder Probe wurde in 1 ml Hepes-Puffer, pH 7,45, suspendiert. Anschließend wurde die Zahl der Leukozyten und Erythrozyten in den Proben gemessen. Außerdem wurden nach Pappenheim gefärbte Präparate angefertigt (2.3.1., 2.3.2.) und die Leukozyten differenziert. Die Ergebnisse sind der Tabelle 3 zu entnehmen:

Tabelle 3: Vergleich der Blutzellpräparationen mit Ficoll-Isopaque-Lösungen verschiedener Dichte

Dichte g/ml	Leuko- zyten $\times 10^3/\mu\text{l}$	Erythro- zyten $\times 10^6/\mu\text{l}$	Lympho- zyten in %	Mono- zyten in %	Baso- phile in %	Eosino- phile Gr. in %
1,072	1 8,7	0,32	74	25	1	/
	2 7,5	0,29	72	26	2	/
1,077	3 8,3	0,23	61	33	4	2
	4 10,4	0,27	Präparat nicht differenzierbar			
1,083	5 9,8	0,28	64	35	1	/
	6 9,9	0,25	Präparat nicht differenzierbar			

Wie man sieht, sind die Unterschiede der Doppelbestimmungen mit der Ficoll-Isopaque-Lösung derselben Dichte etwa genauso groß wie diejenigen zwischen den Proben unter Verwendung von Ficoll-Isopaque-Lösungen verschiedener Dichte.

Je 85 ml heparinisiertes Blut wurden einmal mit PBS-Puffer, pH 7,2, und zum anderen mit 0,9 % NaCl, pH 7,4, je 1 : 1 verdünnt und präpariert wie in 2.2.1. beschrieben. Mit den beiden Zellsuspensionen wurde dann je ein konzentrationsabhängiges Bindungsexperiment durchgeführt. Dies erbrachte fast identische Ergebnisse:

Tabelle 4: Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten

	Leukozyten pro 100 μl	max. Bindungs- kapazität (Mole pro 100 μl Zellen)	Bindungs- stellen pro Zelle	K_D (M)
Mit PBS:	$16,8 \times 10^5$	$0,09 \times 10^{-12}$	32300	$1,7 \times 10^{-9}$
Mit NaCl:	$17,4 \times 10^5$	$0,09 \times 10^{-12}$	31200	$1,5 \times 10^{-9}$

	% Lympho- zyten	Mono- zyten	Basophile Granulo- zyten	Eosinophile Granulo- zyten
Mit PBS:	58	38	2	2
Mit NaCl:	65	32	2	1

Vergleichsweise wurden je 20 ml heparinisiertes Blut derselben Person einmal nach der herkömmlichen Methode, Probe 1 (s. 2.2.1.), und zum anderen ohne Dichtezentrifugation, Probe 2 (s. 2.2.2., vgl. (13)), präpariert. Mit den gewonnenen Zellsuspensionen wurden konzentrationsabhängige Bindungsexperimente durchgeführt. In Probe 1 befanden sich $3,2 \times 10^5$ Zellen, in Probe 2 $4,1 \times 10^5$ Zellen pro 100 μl . Trotz der geringeren Zellzahl war die maximale Bindungskapazität der Probe 1 um 12,5 % höher. Für die Zahl der Bindungsstellen pro Zelle und für die Dissoziationskonstante (K_D) errechneten sich folgende Werte:

	Bindungsstellen pro Zelle	K_D (M)
Probe 1:	30100	$2,2 \times 10^{-9}$
Probe 2:	20600	$3,1 \times 10^{-9}$

Ein interessantes Ergebnis brachte die Differenzierung der Leukozyten in den Proben (in %):

	Lymphozyten	Monozyten	Neutrophile Granulozyten
Probe 1:	88	12	/
Probe 2:	21	7	72

Da also die Probe 2 größtenteils aus neutrophilen Granulozyten bestand, außerdem das Präparat deutlich mehr Erythrozyten enthielt, wurde diese Methode nicht weiter verwendet.

Wie in 2.2.2. angegeben, wurde eine etwas modifizierte Methode in Anlehnung an Bøyum (1976) (16) probiert. Etwa 60 ml Blut wurden einer Versuchsperson abgenommen und die mononukleären Zellen isoliert. Mit der gewonnenen Zellsuspension wurden vier konzentrationsabhängige Bindungsexperimente durchgeführt. In der Probe befanden sich $8,4 \times 10^3$ Leukozyten pro μl und zwar zu 63 % Lymphozyten, zu 36 % Monozyten und zu 1 % basophile Granulozyten. Die Zahl der Bindungsstellen pro Zelle betrug 25500 ± 6300 , für die Dissoziationskonstante (K_D) errechnete sich ein Wert von $2,7 \pm 1,1 \times 10^{-9}$ M.

An einem anderen Tag wurden derselben Person gleichfalls 60 ml Blut entnommen und dieses nach der in 2.2.1. beschriebenen Methode präpariert. Mit der erhaltenen Zellsuspension wurden zwei konzentrationsabhängige Bindungsexperimente durchgeführt. Diese Probe enthielt $13,5 \times 10^3$ Leukozyten/ μl , davon waren 58 % Lymphozyten und 42 % Monozyten. Pro mononukleäre Zelle wurden 20500 Bindungsstellen errechnet, die Dissoziationskonstante (K_D) betrug $2,3 \times 10^{-9}$ M. Diesen Zahlen ist zu entnehmen, daß die beiden Methoden zu identischen Ergebnissen führen.

Je 30 ml heparinisiertes Blut derselben Person wurden, wie in 2.2.1. beschrieben, präpariert und das Sediment in Hepes-Puffer, pH 7,45, der kein PVP enthielt, suspendiert. Die Leukozytenzahl in den beiden Proben wurde gemessen und jeweils ein Teil auf Objektträger zentrifugiert. Danach wurde Probe 1 ge-

pottert, Probe 2 nicht. Es wurde nun je ein konzentrationsabhängiges Bindungsexperiment mit ^3H -Ouabain an mononukleären Zellen durchgeführt. Probe 1 enthielt $7,8 \times 10^3$ Leukozyten pro μl , 53 % Lymphozyten, 44 % Monozyten und 2 % basophile Granulozyten. Die Zellsuspension wirkte homogener als Probe 2, die Doppelwerte stimmten besser überein. Für Versuch 1 errechnete sich eine maximale Bindungskapazität von $0,067 \times 10^{-12}$ M, 51900 Bindungsstellen pro mononukleäre Zelle, wenn man die gebundene Radioaktivität auf die vor dem Pottern bestimmte Zellzahl bezieht, und eine Dissoziationskonstante (K_D) von $1,7 \times 10^{-9}$ M. Die nicht gepotterte Probe enthielt $7,9 \times 10^3$ Leukozyten pro μl , 49 % Lymphozyten, 49 % Monozyten und 2 % basophile Granulozyten. Für Probe 2 erhielt man eine maximale Bindungskapazität von $0,062 \times 10^{-12}$ M, 47300 Bindungsstellen pro mononukleären Leukozyten und eine Dissoziationskonstante (K_D) von $1,4 \times 10^{-9}$ M. Aus diesen Ergebnissen ist zu ersehen, daß das Pottern der Zellen das Bindungsverhalten nicht beeinflußt, aber zu einer gleichmäßigeren Verteilung der Zellen in der Lösung führt. Da aber durch das Pottern viele Zellen kaputtgehen, man damit also die Bindung an ein Zellhomogenat mißt, ist es eigentlich nicht gerechtfertigt, Bindungsstellen pro Zelle zu berechnen. Aus diesem Grund wurde sonst auf das Pottern der Zellen verzichtet.

Etwa 30 ml Blut wurden einer Versuchsperson abgenommen, mit Heparin versetzt und, wie in 2.2.1. beschrieben, präpariert. Die gewonnene Zellsuspension enthielt $7,7 \times 10^3$ Leukozyten pro μl . Für 5 Stunden bei 37°C wurden je 100 μl der Probe zum Teil in 150 mM NaCl, 5,5 mM Glucose, 10 mM Hepes und $1,45 \times 10^{-9}$ M ^3H -Ouabain, zum anderen in 150 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 3 mM ATP und $1,45 \times 10^{-9}$ M ^3H -Ouabain inkubiert. Beide Inkubationsmedien waren mit Imidazol auf pH 7,45 eingestellt. Nach Filtration der Proben und Weiterbehandlung der Filter wurde die gebundene Radioaktivität gemessen. Die Zellen im zuerst angeführten Medium hatten 288 cpm (278, 296, 291) gebunden, im zweiten Medium hatte dieselbe Zellzahl dagegen 354 cpm (342, 354, 365) ergeben, wobei die unspezifisch gebundene Radioaktivität im ersten Fall 17, im zweiten 13 cpm betrug. Bei einer

Wiederholung des Experimentes mit Heparinblut einer anderen Person unter sonst gleichen Bedingungen war der Unterschied noch größer. Die Zellsuspension beinhaltete hier $8,1 \times 10^3$ Leukozyten pro μl . Die Zellen im Hepes-Medium hatten 100 cpm (112,87), diejenigen im anderen Medium dagegen 156 cpm (161, 155, 151) gebunden. Die unspezifisch gebundene Radioaktivität belief sich bei beiden Medien auf 36 cpm.

Abbildungen I - IV:

Präparation der menschlichen mononukleären Leukozyten nach Standardmethode (2.2.1.); Färbung nach Pappenheim (2.3.2.).

- 1: Lymphozyten
- 2: Monozyten
- 3: Neutrophile Granulozyten
- 4: Basophile Granulozyten
- 5: Eosinophile Granulozyten
- 6: Thrombozyten
- 7: Zellschatten

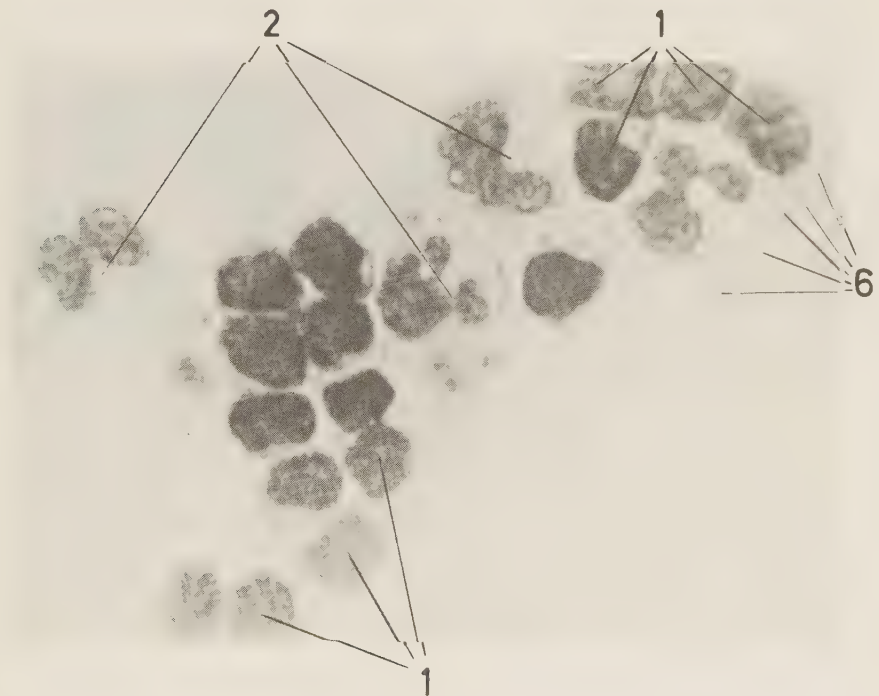


Abb. I

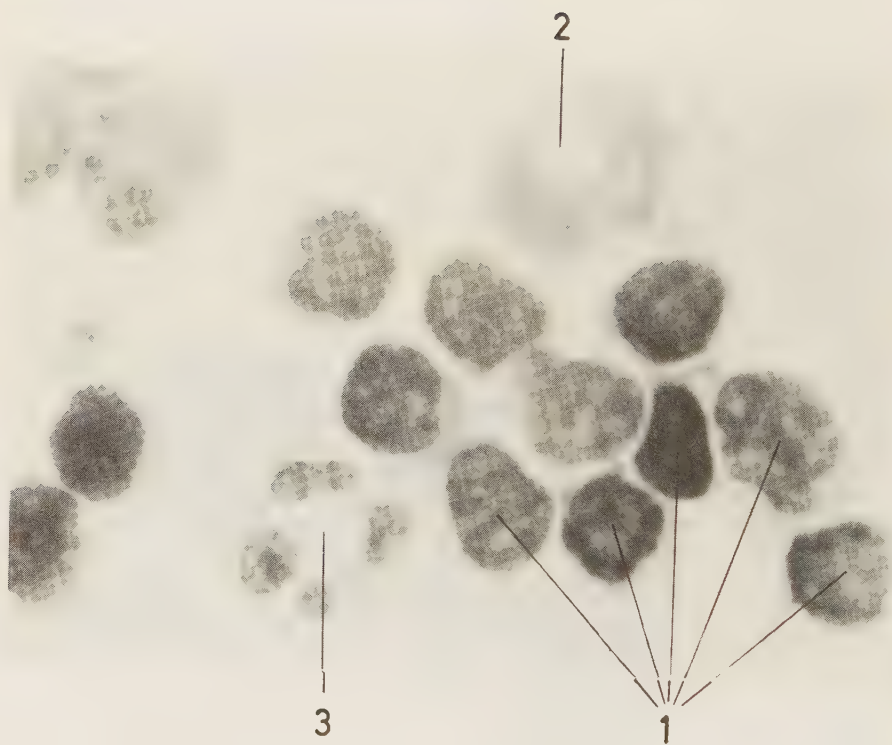


Abb. II

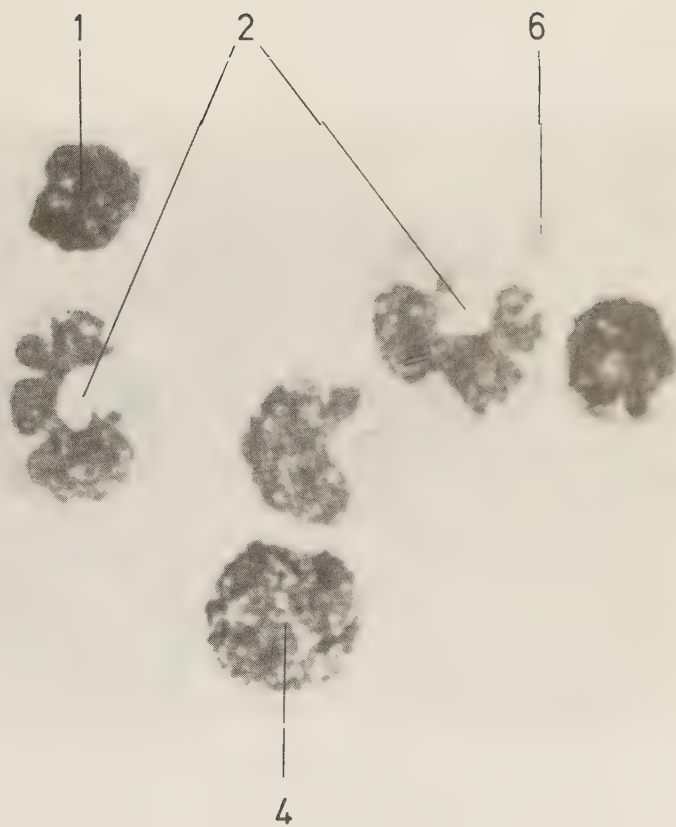


Abb. III



Abb. IV

Abbildung V:

Präparation der menschlichen mononukleären Leukozyten nach Standardmethode (2.2.1.); Naphthol-AS-Acetat-Esterase-Färbung (2.3.4.).

- 1: Lymphozyten mit wenigen blauen Azofarbstoffkörnchen als Ausdruck geringer Esteraseaktivität
- 2: Monozyten mit vielen blauen Azofarbstoffkörnchen als Zeichen hoher Esteraseaktivität

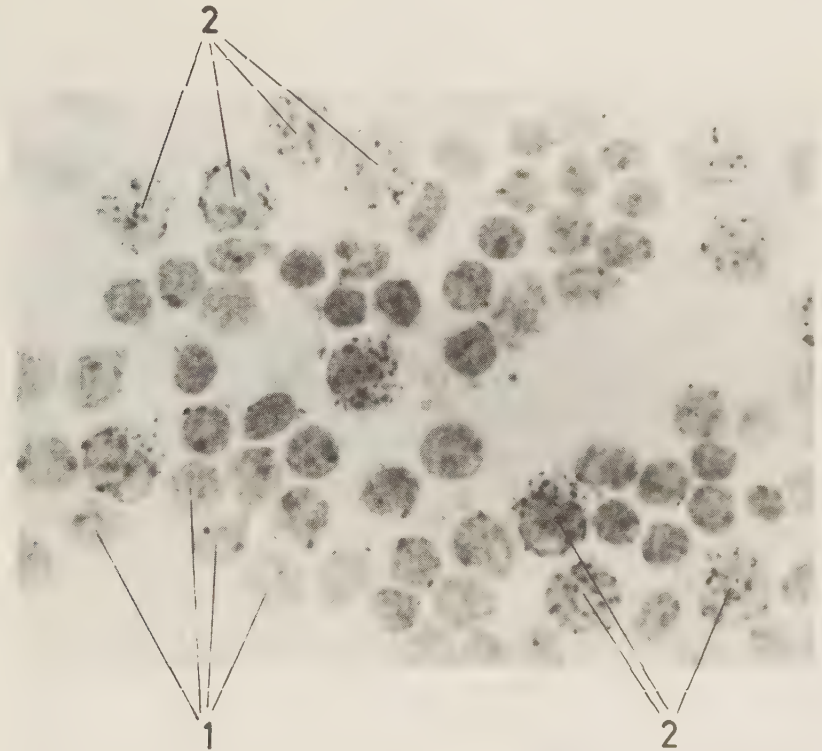


Abb. V

Abb. VI

Gereinigte Präparation der menschlichen mononukleären Leukozyten mit einer Nytonsäule (3.1.3); Färbung nach Pappenheim (2.3.2).

- 1: Lymphozyten
- 2: Zellschatten

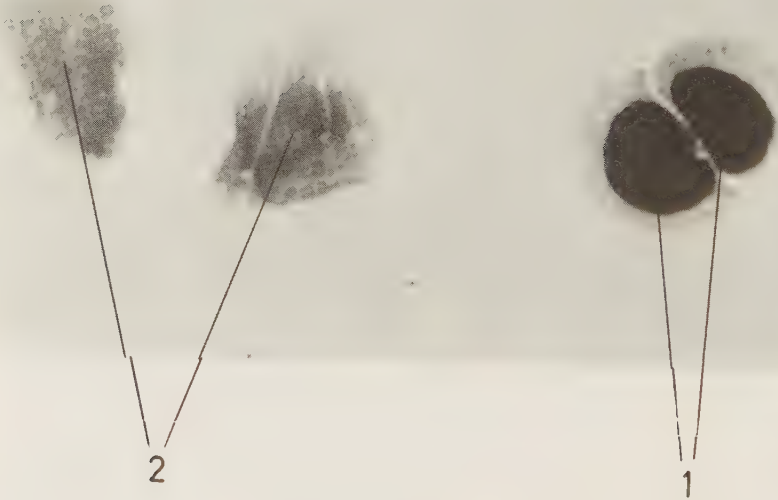


Abb. VI

3.2. Charakterisierung des Herzglykosidrezeptors menschlicher mononukleärer Leukozyten mit ^3H -Ouabain

3.2.1. Spezifische und unspezifische Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten

Bei den Bindungsexperimenten mit menschlichen mononukleären Zellen wurde davon ausgegangen, daß innerhalb der Zellsuspension eine gleichmäßige Verteilung der Zellen vorliegt. Bei der Inkubation desselben Volumens dieser Zellsuspension inkubiert man also stets die gleiche Anzahl an Rezeptoren. Nur die Bindung von Ouabain an seinen Rezeptor gilt als spezifische Bindung. Davon zu unterscheiden ist die unspezifische Bindung, die durch Adhäsion von ^3H -Ouabain an Zellmembranen und Glasfaserfilter oder durch ^3H -Ouabain in Flüssigkeitsrückständen bedingt ist (2.2.7.). Das Herzglykosid Ouabain wurde für die Bindungsstudien gewählt, da es als hochaffin für den Glykosidrezeptor bekannt ist. Es ist außerdem gut wasserlöslich, so daß die unspezifische Bindung sehr gering ist. Die Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten, die man in Gegenwart von $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ oder $2,5 \times 10^{-3} \text{ M}$ nicht markierten Ouabains oder bei Weglassen der für die spezifische Bindung notwendigen Liganden (Na^+ , Mg^{2+} , ATP) im Inkubationsmedium erhielt, wurde als unspezifische Bindung angesehen. Alle drei Methoden erbrachten dieselben Ergebnisse; die unspezifische Bindung machte weniger als 10 % der Gesamtbindung aus.

3.2.2. Zeitabhängige Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten

Die zeitabhängige Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Zellen wurde bei 37°C gemessen (s. 2.2.3.). Die Abbildung 1 zeigt den Verlauf der Bindungskurve. Die reproduzierbare Bindung entspricht dem Kurvenverlauf einer Sättigungskinetik, wobei sich nach etwa drei Stunden ein Äquilibrium einstellt. Der Ouabain-Rezeptor-Komplex bleibt über mindestens sechs Stunden stabil. Die unspezifische Bindung bleibt während der Inkubationszeit von sechs Stunden konstant.

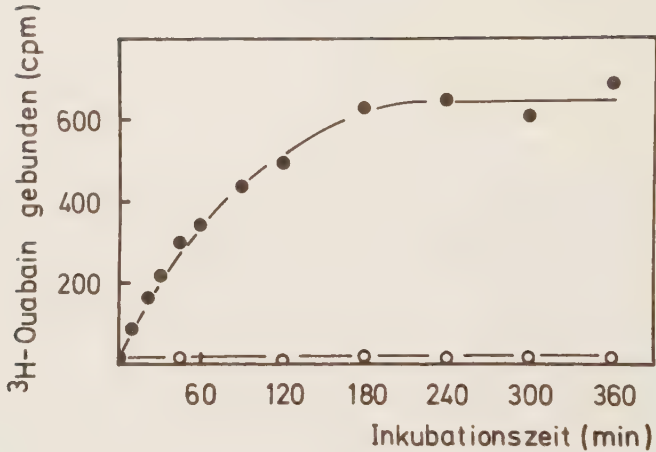


Abb. 1

Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten

Menschliche mononukleäre Leukozyten ($100\ \mu\text{l} \hat{=} 3,16 \times 10^6$ Zellen) wurden bei 37°C in $150\ \text{mM NaCl}$, $3\ \text{mM MgCl}_2$, $3\ \text{mM ATP}$, $1\ \%$ PVP und $1,4 \times 10^{-9}\ \text{M}$ ^3H -Ouabain, mit Imidazol auf pH 7,4 eingestellt, inkubiert. Gesamtvolumen $2,0\ \text{ml}$.

Zu den angegebenen Zeiten wurde die Bindungsreaktion durch rasches Abfiltrieren über Glasfaserfilter gestoppt. Die zellgebundene Radioaktivität auf den Filtern wurde gemessen (s. 2.2.5.).

- Gesamtbindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten
- ^3H -Ouabain-Bindung in Gegenwart von $5 \times 10^{-4}\ \text{M}$ nicht radioaktiv markierten Ouabains (= unspezifische Bindung, s. 2.2.7.)

3.2.3. Geschwindigkeitskonstanten der Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten

Da die Bindung von Ouabain an den Herzglykosidrezeptor anderer Zellen oder Zellmembranen dem Massenwirkungsgesetz gehorcht (45, 53, 71) und somit reversibel ist, ist es möglich, die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} des Ouabain-Rezeptor-Komplexes zu ermitteln und daraus die Dissoziationskonstante (K_D) zu errechnen (2.5.2.).

Die initiale Assoziation der Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Zellen wurde gemessen (2.2.8.). In Abb. 2 A sind die Werte zeitabhängig aufgetragen.

Um die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} durch Einsetzen der experimentellen Daten in eine Reaktionsgleichung 2. Ordnung (Gleichung 3, 2.5.2.) berechnen zu können, wurde gleichzeitig ein konzentrationsabhängiges Bindungsexperiment durchgeführt. Aus der maximalen Bindungskapazität in der Scatchard-Auftragung (2.5.3.) ließ sich unter Berücksichtigung der verschiedenen Zellzahlen in den Proben für das konzentrationsabhängige Bindungsexperiment und für die Assoziation die Anfangskonzentration des freien Rezeptors bestimmen. Setzt man nun alle Werte versuchsweise in die Reaktionsgleichung für Reaktionen 2. Ordnung ein und trägt sie zeitabhängig auf (Abb. 2 B), erhält man eine Gerade, was zeigt, daß es sich tatsächlich um eine Reaktion 2. Ordnung handelt. Die Steigung der Geraden entspricht der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{+1} .

Die Geschwindigkeitskonstante, mit der ^3H -Ouabain von menschlichen mononukleären Leukozyten abdissoziiert, wenn nicht markiertes Ouabain in hoher Konzentration zugegeben wird, k_{-1} , wurde experimentell bestimmt (2.2.9.). Bei zeitabhängiger, halblogarithmischer Auftragung des gebundenen ^3H -Ouabains in % (Abb. 3) kann man erkennen, daß die Dissoziation des Ouabain-Rezeptor-Komplexes einer Reaktionskinetik 1. Ordnung folgt.

Aus der Neigung der Geraden läßt sich die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} errechnen. Der Quotient aus k_{-1} und k_{+1} entspricht der Dissoziationskonstanten (K_D). Die Tabelle 5 zeigt den Vergleich der Bestimmungen der Dissoziationskonstanten des Ouabain-Rezeptor-Komplexes aus dem Quotienten der beiden Geschwindigkeitskonstanten und aus der konzentrationsabhängigen Bindung von ^3H -Ouabain unter Gleichgewichtsbedingungen. Die Assoziation und Dissoziation sowie das konzentrationsabhängige Bindungsexperiment mit Blut desselben Probanden wurden am gleichen Tag durchgeführt. Die im Rahmen der experimentellen Fehlerbreite gute Übereinstimmung der Werte spricht für die Genauigkeit der Methode.

Tabelle 5: Kinetische Konstanten für die Bindung von
 ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten

	k_{-1} (sec^{-1})	k_{+1} ($\text{Mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$)	$\frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_D$ (M)	K_D (M) Scatchard
1. Proband:	$7,9 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^4$	$2,9 \times 10^{-9}$	$1,9 \times 10^{-9}$
2. Proband:	$8,2 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^4$	$1,7 \times 10^{-9}$	$1,9 \times 10^{-9}$

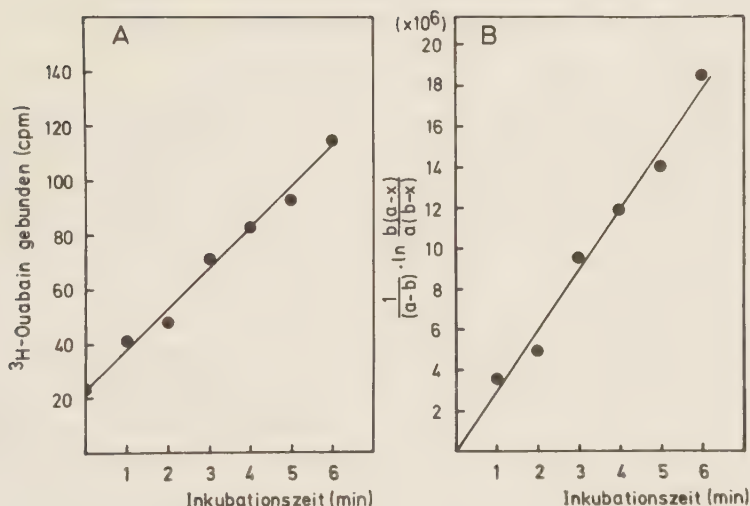


Abb. 2

Assoziation von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten

Menschliche mononukleäre Leukozyten ($200 \mu\text{l} \hat{=} 4,1 \times 10^6$ Zellen) wurden in 150 mM NaCl , 3 mM MgCl_2 , 3 mM ATP , $1 \% \text{ PVP}$ und $2,75 \times 10^{-9} \text{ M } ^3\text{H}$ -Ouabain, mit Imidazol auf pH 7,45 eingestellt, inkubiert.

Gesamtvolumen $2,0 \text{ ml}$.

A: Zu den angegebenen Zeiten wurde die Bindungsreaktion durch rasches Abfiltrieren über Glasfaserfilter gestoppt. Die membrangebundene Radioaktivität auf den Filtern wurde in cpm gemessen (s. 2.2.5.).

B: In Abb. 2 B sind die Werte, die man erhält, wenn man die spezifischen Bindungsdaten in eine Reaktionsgleichung 2. Ordnung (Gleichung 3) einsetzt, zeitabhängig aufgetragen. Da die Kurve während der Meßzeit linear verläuft, entspricht die Steigung der Geraden der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{+1} .

a = Ouabain-Anfangskonzentration ($2,75 \times 10^{-9} \text{ M}$)

b = Anfangskonzentration des freien Rezeptors ($8,3 \times 10^{-11} \text{ M}$)

x = Menge des ^3H -Ouabain-Rezeptor-Komplexes zur Zeit t (sec)

Die zur Zeit 0 gemessene zellgebundene Radioaktivität wurde als unspezifische Bindung betrachtet.

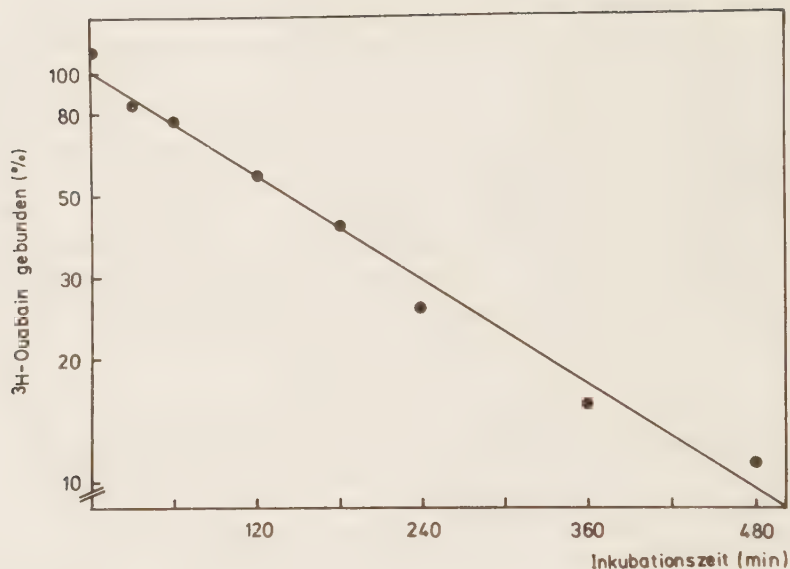


Abb. 3

Dissoziation des Ouabain-Rezeptor-Komplexes aus menschlichen mononukleären Leukozyten

Menschliche mononukleäre Leukozyten ($2,7 \text{ ml} \hat{=} 1,2 \times 10^8$ Zellen) wurden bei 37°C fünf Stunden lang in 150 mM NaCl , 3 mM MgCl_2 , 3 mM ATP , $1\% \text{ PVP}$ und $2,75 \times 10^{-8} \text{ M } ^3\text{H-Ouabain}$, mit Imidazol auf $\text{pH } 7,45$ eingestellt, inkubiert.

Gesamtvolumen $6,0 \text{ ml}$.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das zellgebundene $^3\text{H-Ouabain}$ vom überschüssigen, freien $^3\text{H-Ouabain}$ durch Zentrifugation (1500 Upm , 10 Min.) getrennt. Das Sediment wurde in $3 \text{ ml Hepes-Puffer}$, $\text{pH } 7,45$, suspendiert. Jeweils $100 \mu\text{l}$ dieser Suspension des $^3\text{H-Ouabain-Rezeptor-Komplexes}$ wurden bei 37°C in 150 mM NaCl , 3 mM MgCl_2 , 3 mM ATP , $1\% \text{ PVP}$ und $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ nicht radioaktiv markiertem Ouabain, $\text{pH } 7,45$, inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde die dann noch membrangebundene Radioaktivität rasch abfiltriert und gemessen. Die nach zwölf Stunden Inkubation noch meßbare gebundene Radioaktivität wurde als unspezifische Bindung bezeichnet. Aus der Neigung der Geraden wurde die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante errechnet.

3.2.4. Konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten

Die Dissoziationskonstante (K_D) für die Bindung von Ouabain an menschliche mononukleäre Zellen wurde durch konzentrationsabhängige Bindungsstudien unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelt. Die für menschliche Leukozyten erforderliche Inkubationszeit bis zum Erreichen eines Äquilibriums wurde zuvor durch eine zeitabhängige Bindung von ^3H -Ouabain bestimmt (s. 3.2.2.).

Bei gleichbleibender Rezeptorkonzentration führt eine steigende Ouabain-Konzentration im Inkubationsmedium bis zu einer Sättigung zu einer vermehrten Bindung von Ouabain (Abb. 4 A). Sind alle Rezeptoren mit einem Ouabain-Molekül besetzt, vermag auch eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration die Konzentration des Ouabain-Rezeptor-Komplexes nicht mehr zu steigern.

Legt man an das Plateau der Sättigungskurve eine Asymptote an, erhält man die maximale Bindungskapazität der inkubierten Zellen für Ouabain aus dem Schnittpunkt dieser Asymptote mit der Ordinate. Die Konzentration an Ouabain bei halbmaximaler Bindungskapazität entspricht der Dissoziationskonstanten (K_D).

In Abbildung 4 B sind dieselben Bindungsdaten nach Scatchard (116) aufgetragen (s. 2.5.3.). Durch die Meßpunkte läßt sich eine Gerade legen, deren negative Steigung der Dissoziationskonstanten (K_D) entspricht. Ein weiterer Vorteil dieser Auftragsweise besteht darin, daß der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate nun direkt die maximal mögliche spezifische Bindung für Ouabain aller im Inkubationsmedium vorhandenen mononukleären Zellen ergibt. Die lineare Beziehung zwischen der Konzentration des Ouabain-Rezeptor-Komplexes und dem Quotienten aus gebundenem und freiem Ouabain läßt vermuten, daß menschliche mononukleäre Leukozyten nur einen einzigen Ouabain-Rezeptortyp besitzen, da die Affinität aller Rezeptoren im gemessenen Konzentrationsbereich ($0,7 \times 10^{-9}$ M bis 5×10^{-4} M) unabhängig von der Ouabainkonzentration ist.

In Abb. 4 C sind dieselben Bindungsdaten nach Woolf (80) aufgetragen (s. 2.5.4.). Auch in dieser Darstellungsart erhält man eine Gerade, was ebenfalls auf das Vorliegen nur eines Rezeptortyps hinweist. Die Steigung der Geraden entspricht $\frac{1}{B_{\max}}$, ihr Schnittpunkt mit der y-Achse dem Quotienten aus K_D und $B_{\max}$.

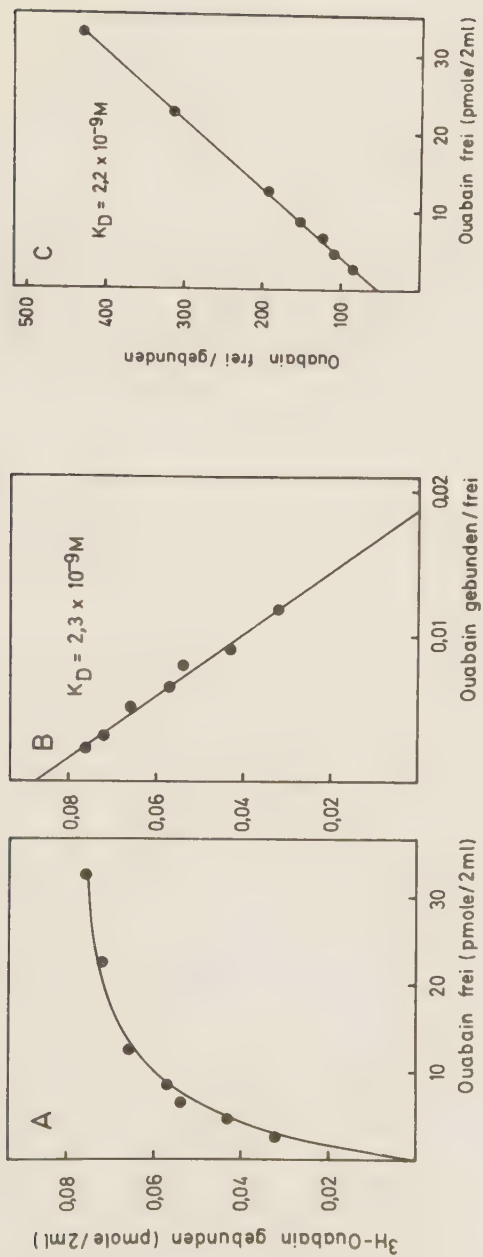


Abb. 4

Abb. 4

Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten

100 μl einer Suspension menschlicher mononukleärer Leukozyten ($\approx 1,6 \times 10^6$ Zellen) wurden fünf Stunden lang bei 37°C in 150 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 3 mM ATP, 1 % PVP, $1,4 \times 10^{-9}$ M ^3H -Ouabain und steigenden Konzentrationen (1×10^{-8} M bis $1,5 \times 10^{-8}$ M) nicht markierten Ouabains inkubiert.

Gesamtvolumen 2,0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Bindungsreaktion durch rasches Abfiltrieren über Glasfaserfilter gestoppt. Die membrangebundene Radioaktivität auf den Filtern wurde gemessen (s. 2.2.5.). Die unspezifische Bindung von ^3H -Ouabain an die mononukleären Zellen wurde in Gegenwart von 5×10^{-4} M nicht markierten Ouabains bestimmt. Die Bindungsdaten der Abb. 4 A sind in Abb. 4 B nach Scatchard, in Abb. 4 C nach Woolf aufgetragen.

3.3. Bestimmung der Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleären Leukozyten und Messung der Dissoziationskonstanten (K_D) an einem Normalkollektiv

3.3.1. Aufstellung aller Messungen an Normalpersonen

Konzentrationsabhängige Bindungsstudien mit ^3H -Ouabain wurden an mononukleären Leukozyten von Normalpersonen durchgeführt. Mit Blut von 34 gesunden Mitarbeitern der Klinik (16 Frauen, 18 Männer) mit im Normbereich liegenden Serum-Kalium-Werten wurden insgesamt 133 Messungen vorgenommen. Das Durchschnittsalter dieser Personen betrug 29 Jahre (20 - 55 J.). Das Blut wurde nach der in 2.2.1. beschriebenen Methode präpariert. Die prozentualen Anteile der einzelnen Leukozytenarten in den Proben sind in 3.1.1. angegeben. Die experimentellen Daten wurden nach Scatchard (116) aufgetragen (2.5.3.). Es errechneten sich 34600 ± 9700 Bindungsstellen pro mononukleäre Zelle und eine Dissoziationskonstante (K_D) von $2,8 \pm 1,2 \times 10^{-9}$ M.

Bei der Berechnung der Bindungsstellen pro Zelle wurde idealisierterweise davon ausgegangen, daß alle Zellen gleich groß sind und genausoviele Rezeptoren haben. Da es sich jedoch um ein Zellgemisch hauptsächlich von Lymphozyten und Monozyten handelt, ist dies eigentlich nicht korrekt. Um zu prüfen, ob sich die Zahl der Bindungsstellen pro Zelle in Abhängigkeit vom prozentualen Anteil an Monozyten ändert, wurden diese beiden Größen gegeneinander aufgetragen (Abb. 5). Die Werte in Abb. 5 lassen keinerlei Abhängigkeit voneinander erkennen. Geht man von diesen Ergebnissen aus, liegt die Vermutung nahe, daß zumindest unter unseren Versuchsbedingungen Lymphozyten und Monozyten das gleiche Bindungsverhalten zeigen.

Weiter wurde untersucht, ob sich die Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleäre Zelle mit dem Serum-Kalium-Spiegel ändert (Abb. 6). Auch hier ließ sich keine Abhängigkeit feststellen.

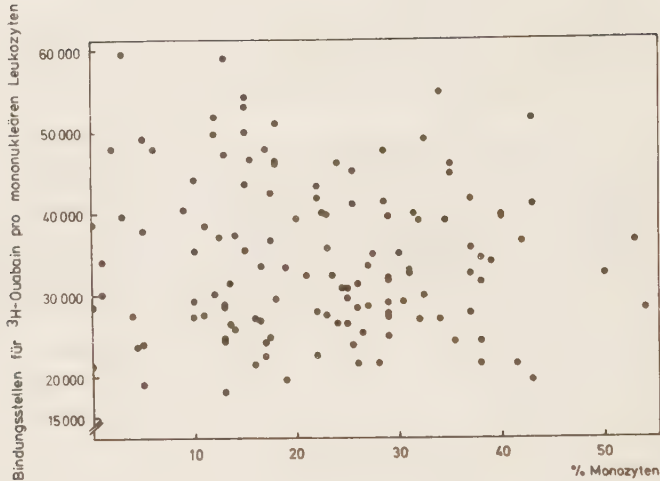


Abb. 5

Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleären Leukozyten von Normalpersonen in Abhängigkeit vom prozentualen Anteil an Monozyten

Die Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleäre Zelle von Normalpersonen (34 Personen, 133 Messungen) wurde durch konzentrationsabhängige Bindungsstudien und Auswertung der experimentellen Daten nach Scatchard bestimmt (s. 2.2.4. und 2.5.3.). Bei jedem Versuch wurde ein Teil der Zellsuspension auf Objektträger aufgebracht. Diese wurden nach Pappenheim gefärbt und die Zellen dann differenziert (2.3.2.).

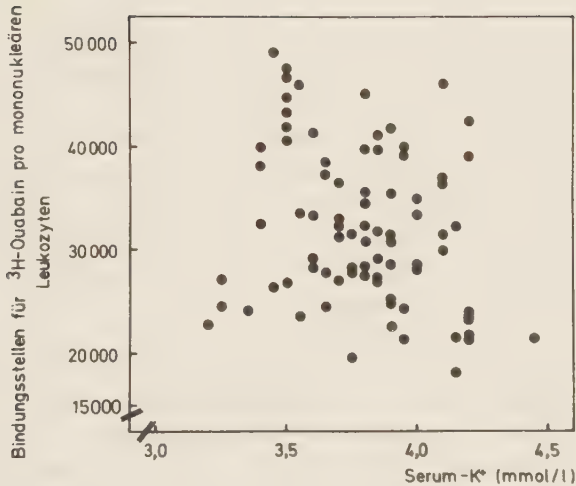


Abb. 6

Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleären Leukozyten von Normalpersonen in Abhängigkeit vom Serum-Kalium-Spiegel

Die Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleäre Zelle wurde an Normalpersonen (19 Personen, 81 Messungen) durch konzentrationsabhängige Bindungsstudien und Auswertung der Bindungsdaten nach Scatchard bestimmt (s. 2.2.4. und 2.5.3.).[†] Nach der Blutabnahme wurde außerdem jeweils das Serum- K^+ (in mmol/l) dieser Personen gemessen (2.4.1.).

3.3.2. Intraindividuelle Schwankung der Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleären Leukozyten von Normalpersonen

Mit Blut von drei Normalpersonen wurden wiederholt konzentrationsabhängige Bindungsstudien (2.2.4.) mit ^3H -Ouabain an mononukleären Zellen durchgeführt und nach Scatchard (116) ausgewertet. Den Verlauf der Werte zeigt Abb. 7. Auch diese Meßdaten wurden auf eine eventuelle Abhängigkeit vom prozentualen Anteil an Monozyten in der Probe und vom Serum-Kalium-Spiegel der Versuchspersonen untersucht (Abb. 8 und 9). Wie den Abbildungen zu entnehmen ist, ließ sich aber auch hier keine lineare Beziehung herstellen.

Die experimentellen Daten der konzentrationsabhängigen Bindungsstudien wurden außer nach Scatchard (2.5.3.), auch nach Woolf (80) (2.5.4.) ausgewertet. Die Ergebnisse für die maximale Bindungskapazität und die Dissoziationskonstante (K_D) beider Methoden wurden mit einem T-Test für verbundene Stichproben verglichen. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 6 zusammengestellt:

Tabelle 6: Vergleich zweier Auswertungsmethoden von Bindungsstudien mit ^3H -Ouabain an menschlichen mononukleären Leukozyten

Max. Bindungskapazität ($B_{\max}$) ($\times 10^{-12}$ Mole pro 100 μl Zellen)					
	Scatchard-Plot	Woolf-Plot	T-Wert	p-Wert	
♀, 23 J.	$0,065 \pm 0,035$	$0,067 \pm 0,035$	2,06	0,056	(n = 17)
♀, 25 J.	$0,089 \pm 0,043$	$0,090 \pm 0,041$	0,45	0,664	(n = 13)
♂, 38 J.	$0,084 \pm 0,050$	$0,086 \pm 0,051$	1,67	0,118	(n = 15)
Dissoziationskonstante (K_D) ($\times 10^{-9}$ M)					
	Scatchard-Plot	Woolf-Plot	T-Wert	p-Wert	
♀, 23 J.	$3,21 \pm 1,15$	$3,49 \pm 1,50$	2,26	0,038	(n = 17)
♀, 25 J.	$2,84 \pm 0,90$	$3,17 \pm 1,56$	1,42	0,180	(n = 13)
♂, 38 J.	$2,43 \pm 0,94$	$2,68 \pm 1,36$	1,82	0,090	(n = 15)

In allen Fällen ergab der Woolf-Plot höhere Werte sowohl für die maximale Bindungskapazität als auch für die Dissoziationskonstante, jedoch war nur der Unterschied der Werte für die Dissoziationskonstante der 23jährigen, weiblichen Versuchsperson signifikant.

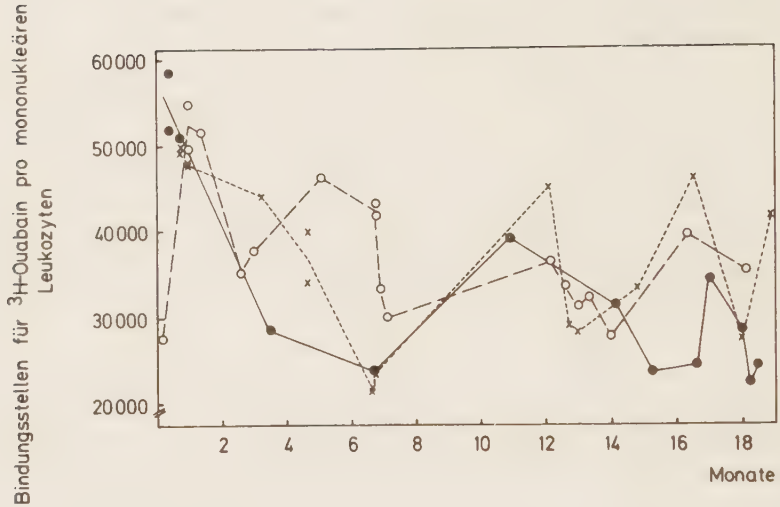


Abb. 7

Zeitliche Änderung der Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleären Leukozyten von Normalpersonen

In einem Zeitraum von 18 Monaten wurde die Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleäre Zelle durch konzentrationsabhängige Bindungsstudien und Auswertung der experimentellen Daten nach Scatchard an drei Normalpersonen mehrfach bestimmt (s. 2.2.4. und 2.5.3.),

o - - o ♀, 23 J. (n = 18)

● — ● ♀, 25 J. (n = 13)

x --- x ♂, 38 J. (n = 17)

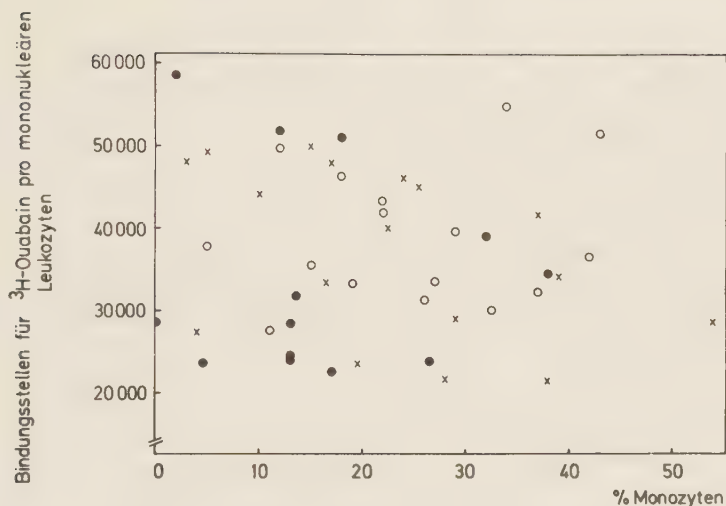


Abb. 8

Zeitliche Änderung der Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleären Leukozyten von Normalpersonen in Abhängigkeit vom prozentualen Anteil an Monozyten

Die Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleäre Zelle wurde durch konzentrationsabhängige Bindungsstudien und Auswertung der experimentellen Daten nach Scatchard an drei Normalpersonen mehrfach bestimmt (s. 2.2.4. und 2.5.3.).

Bei jedem Versuch wurde ein Teil der Zellsuspension auf Objektträger zentrifugiert. Die Präparate wurden nach Pappenheim gefärbt und anschließend die Zellen differenziert (2.3.2.).

- o ♀, 23 J. (n = 16)
- ♀, 25 J. (n = 13)
- x ♂, 38 J. (n = 17)

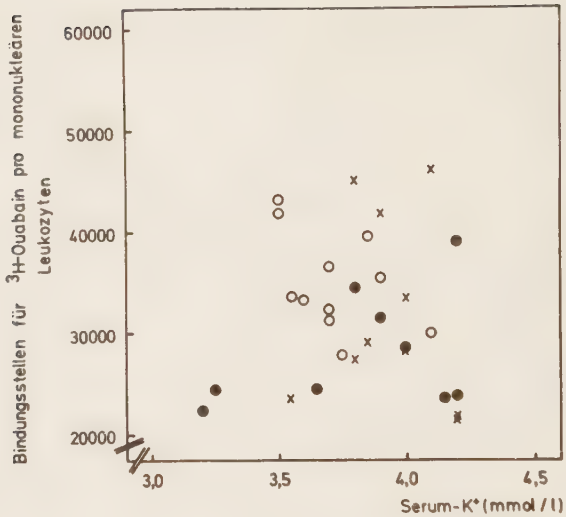


Abb. 9

Zeitliche Änderung der Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleären Leukozyten von Normalpersonen in Abhängigkeit vom Serum-Kalium-Spiegel

Die Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleäre Zelle wurde durch konzentrationsabhängige Bindungsstudien und Auswertung der experimentellen Daten nach Scatchard an drei Normalpersonen mehrfach bestimmt (s. 2.2.4. und 2.5.3.). Nach der Blutabnahme wurde außerdem jeweils das Serum-K⁺ dieser Personen gemessen (2.4.1.).

○ ♀, 23 J. (n = 11)

● ♀, 25 J. (n = 9)

x ♂, 38 J. (n = 10)

3.3.3. Interindividuelle Schwankung der Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleären Leukozyten von Normalpersonen

Um eine Vorstellung von der interindividuellen Schwankung der Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleäre Zelle, für die Dissoziationskonstante (K_D) und den Serum-Kalium-Spiegel zu bekommen, sind in Tabelle 7 alle Daten der Personen aufgeführt, mit deren Blut mehrfach Messungen durchgeführt wurden. Man sieht an den hohen Werten für die Standardabweichung, daß die intraindividuelle Schwankung, wie schon in 3.3.2. gezeigt, sehr groß ist. Berücksichtigt man dies, werden die scheinbar großen Unterschiede zwischen verschiedenen Personen stark relativiert.

Tabelle 7: Affinität und Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain menschlicher mononukleärer Leukozyten von elf gesunden Probanden

	Ge- schlecht	Alter (Jahre)	Serum- $\text{K}^+_{\text{+s}}$ (mmol/l)	$\text{K}_D \pm s$ ($\times 10^{-9}$ M)	Rezeptoren/ Zelle $\pm s$ ($\times 10^3$)
1	♀	20	3,8 (n = 2)	$2,4 \pm 0,3$ (n = 4)	$32,0 \pm 7,0$ (n = 4)
2	♀	20	$3,8 \pm 0,4$ (n = 3)	$4,7 \pm 1,9$ (n = 3)	$25,5 \pm 3,6$ (n = 3)
3	♀	24	$3,7 \pm 0,3$ (n = 4)	$4,4 \pm 1,9$ (n = 4)	$33,5 \pm 2,4$ (n = 4)
4	♀	24	$3,7 \pm 0,2$ (n = 3)	$2,3 \pm 0,5$ (n = 3)	$37,8 \pm 7,3$ (n = 3)
5	♀	30	$3,8 \pm 0,2$ (n = 3)	$2,0 \pm 0,3$ (n = 3)	$27,3 \pm 2,7$ (n = 3)
6	♀	56	$3,9 \pm 0,3$ (n = 3)	$1,9 \pm 0,1$ (n = 3)	$28,2 \pm 10,2$ (n = 3)
7	♂	23	$3,8 \pm 0,3$ (n = 4)	$2,7 \pm 0,9$ (n = 4)	$35,0 \pm 9,2$ (n = 4)
8	♂	23	3,7 (n = 1)	$4,6 \pm 1,4$ (n = 7)	$36,5 \pm 12,1$ (n = 7)
9	♂	29	$4,0 \pm 0,2$ (n = 3)	$2,7 \pm 1,0$ (n = 3)	$22,7 \pm 2,9$ (n = 3)
10	♂	32		$2,5 \pm 0,8$ (n = 7)	$27,3 \pm 10,4$ (n = 7)
11	♂	35	$3,7 \pm 0,3$ (n = 3)	$3,2 \pm 0,9$ (n = 4)	$38,0 \pm 2,2$ (n = 4)

3.4. Messungen an Patienten mit chronischer Hypokaliämie

An acht Patienten (3 Frauen, 5 Männer) mit chronischer Hypokaliämie wurde die Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain mononukleärer Leukozyten gemessen. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 58 Jahre (zwischen 41 und 69 Jahre). Die Serum-Kalium-Spiegel dieser Patienten waren kleiner oder gleich 3,5 mmol/l ($3,3 \pm 0,2$ mmol/l). Die Hypokaliämie war bei allen acht Patienten auf eine langdauernde Diuretikabehandlung zurückzuführen. Bei drei Patienten wurde die Hypokaliämie durch größeren Alkoholkonsum, bei einer Patientin durch chronischen Laxantienabusus noch zusätzlich verstärkt. Die Zahl der Bindungsstellen pro mononukleäre Zelle betrug 34900 ± 10500 ($n = 11$). Für die Dissoziationskonstante (K_D) errechnete sich ein Wert von $3,2 \pm 0,9 \times 10^{-9}$ M. (Einzelwerte siehe Tabelle 8).

Diese Ergebnisse unterscheiden sich nicht signifikant von den für Normalpersonen erhaltenen Werten (3.3.).

Tabelle 8: Affinität und Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain menschlicher mononukleärer Leukozyten von acht Patienten mit chronischer Hypokaliämie

	Ge- schlecht	Alter (Jahre)	Serum- K^+ (mmol/l)	Kalium/kg KG (Gramm)	K_D ($\times 10^{-9}$ M)	Rezeptoren/ Zelle ($\times 10^3$)
1	♀	41	3,5		3,3 4,0	19,6 24,7
2	♀	60	3,5		2,5	45,9
3	♀	69	3,1	0,87 Norm: 1,31 $\pm$ 0,15	4,4	44,1
4	♂	45	3,3		1,8 3,7	25,8 29,4
5	♂	58	3,4		4,7	48,4
6	♂	59	3,5		2,2 3,3	36,2 36,9
7	♂	66	3,3		2,9	25,2
8	♂	66	3,1	1,32 Norm: 1,75 $\pm$ 0,21	2,7	47,5

3.5. Einfluß verschiedener Diuretika auf die Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleären Leukozyten und auf die Dissoziationskonstante (K_D)

3.5.1. Hydrochlorothiazid

Durch die Gabe von 25 mg Hydrochlorothiazid täglich für vier Monate wurde versucht, den Serum-Kalium-Spiegel von drei gesunden Versuchspersonen zu senken. Vor, während und nach dem Einnahmezeitraum wurde die Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain mononukleärer Leukozyten dieser Personen und die Dissoziationskonstante (K_D) der Bindung bestimmt. Das Serum-Kalium (2.4.1.) und das Ganzkörper-Kalium (2.4.2.) wurden mehrfach gemessen. Die einzelnen experimentellen Daten sind in Abb. 10 zusammengestellt.

3.5.2. Piretanid

Vier gesunde Versuchspersonen nahmen für vier Monate 6 mg Piretanid täglich ein. Vor, während und nach dieser Zeit wurde die Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain mononukleärer Leukozyten dieser Personen und die Dissoziationskonstante (K_D) der Bindung bestimmt. Das Serum-Kalium (2.4.1.) und das Ganzkörper-Kalium (2.4.2.) wurden mehrfach gemessen. Die einzelnen experimentellen Daten sind in Abb. 11 zusammengestellt.

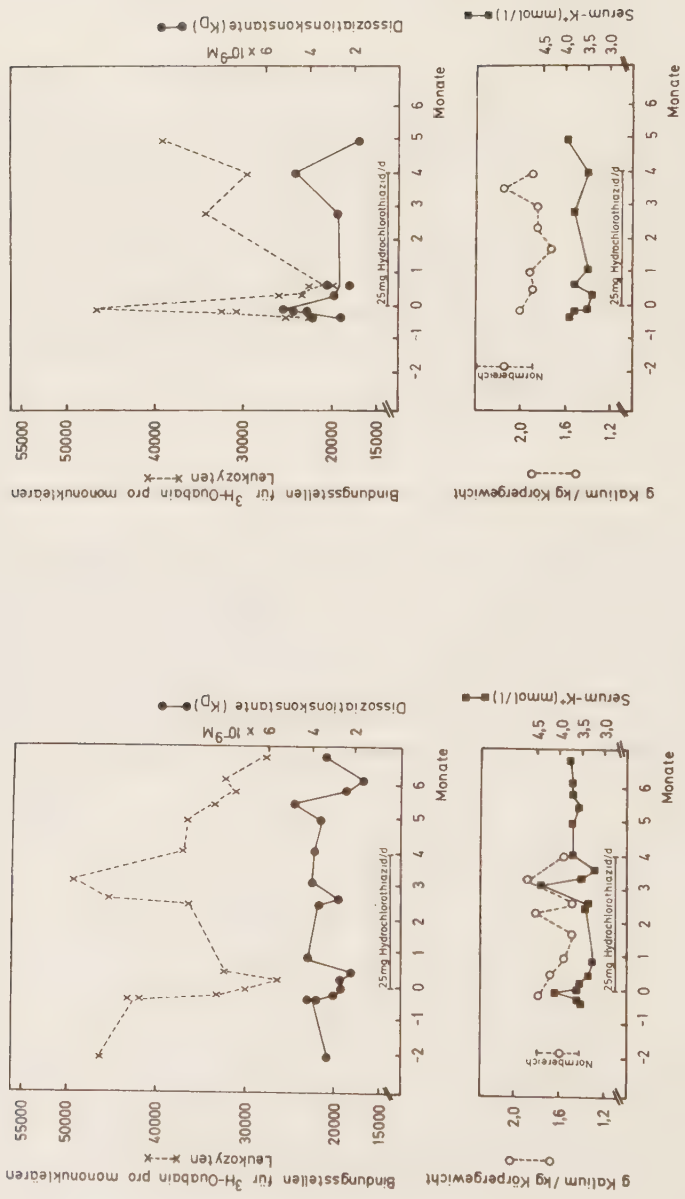


Abb. 10 A

Abb. 10 B

Abb. 10

Einfluß von Hydrochlorothiazid auf das Serum-Kalium und das Ganzkörper-Kalium von Normalpersonen und auf die Affinität und die Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleären Leukozyten dieser Personen.

Für vier Monate nahmen drei Versuchspersonen täglich 25 mg Hydrochlorothiazid ein. Die Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleäre Zelle dieser Personen und die Affinität der Bindung wurde vor, während und nach der Einnahmezeit durch Konzentrationsabhängige Bindungsstudien und Auswertung der experimentellen Daten nach Scatchard ermittelt (s. 2.2.4. und 2.5.3.). Außerdem Serum-Kalium bestimmt (2.4.1.). Außerdem wurde das Ganzkörper-Kalium der Probanden mehrfach gemessen (2.4.2.). Die individuellen Normalwerte für das Kalium/kg Gewicht sind nach Oberhausen und Koepe angegeben.

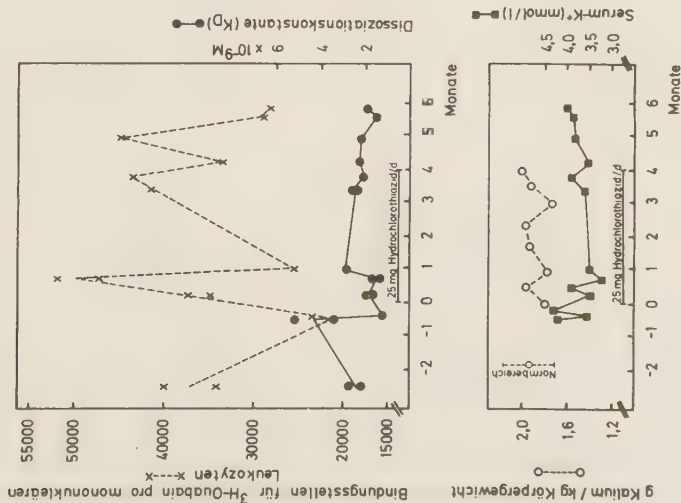


Abb. 10 C

Abb. 10 A: ♀, 23 J.

Abb. 10 B: ♂, 23 J.

Abb. 10 C: ♂, 38 J.

Abb. 11 A

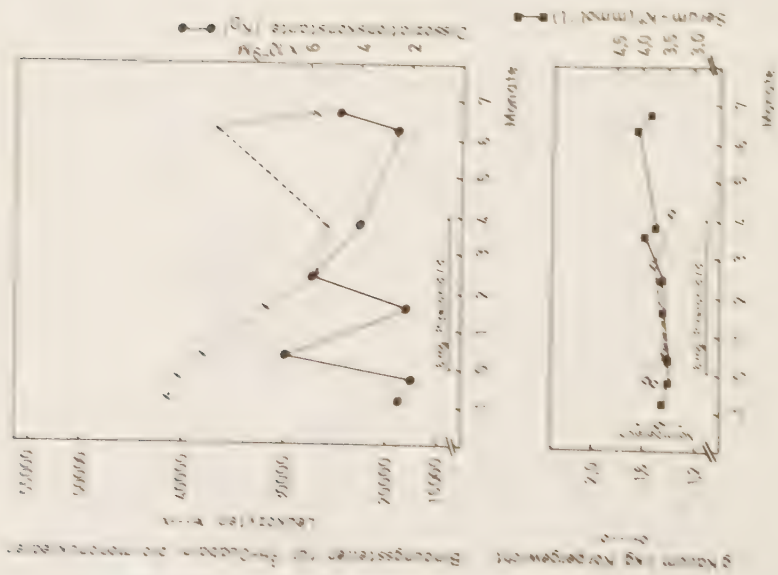
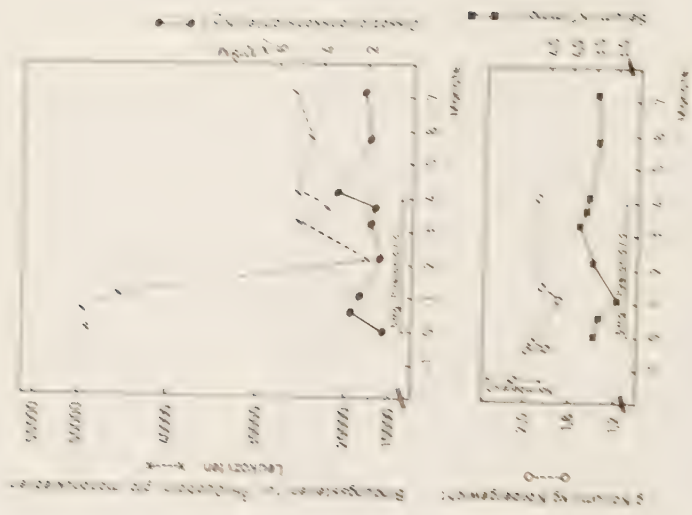
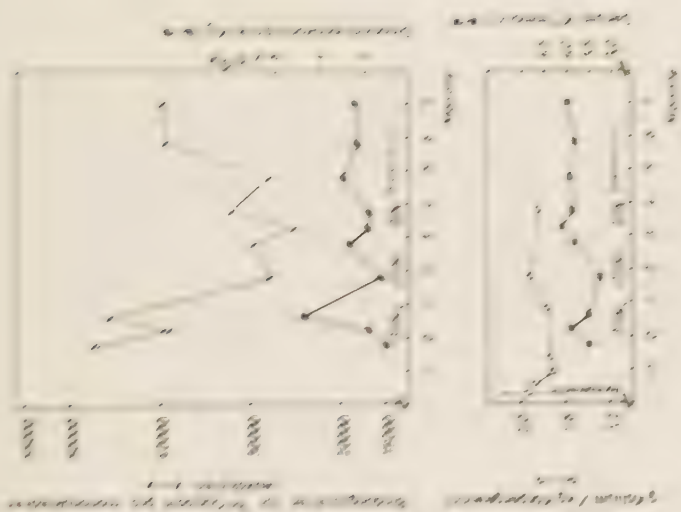
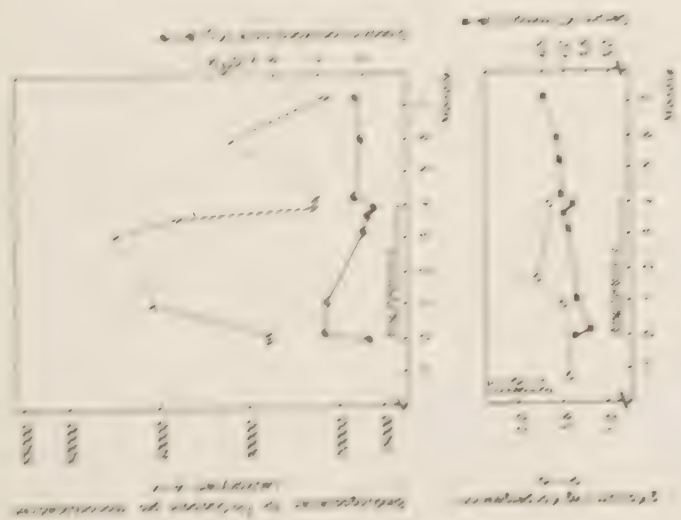


Abb. 11 B





1111



Apr. 11.

Abb. 11

Einfluß von Piretanid auf das Serum-Kalium und das Ganzkörper-Kalium von Normalpersonen und auf die Affinität und die Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleären Leukozyten dieser Personen

4 Versuchspersonen nahmen 4 Monate lang Piretanid (6 mg/d, 1 Person nach etwa 2 Monaten 3 mg/d) ein. Die Zahl der Bindungsstellen für ^3H -Ouabain pro mononukleäre Zelle dieser Personen und die Affinität der Bindung wurde vor, während und nach der Einnahmezeit durch konzentrationsabhängige Bindungsstudien und Auswertung der experimentellen Daten nach Scatchard ermittelt (s. 2.2.4. und 2.5.3.). Gleichzeitig wurde auch jeweils das Serum-Kalium bestimmt (2.4.1). Außerdem wurde das Ganzkörper-Kalium der Probanden mehrfach gemessen (2.4.2.). Die individuellen Normalwerte für das Kalium/kg Gewicht sind nach Oberhausen und Koepe angegeben.

Abb. 11 A: ♀, 37 J.

Abb. 11 B: ♂, 26 J.

Abb. 11 C: ♂, 30 J.

Abb. 11 D: ♂, 37 J.

4. DISKUSSION

4.1. Präparation und Charakterisierung menschlicher mononukleärer Leukozyten

Bindungsstudien mit Herzglykosiden sind aus ethischen Gründen am menschlichen Herzen in vivo nicht möglich, deshalb muß auf besser zugängliche Zellen zurückgegriffen werden. Über das Bindungsverhalten von Herzglykosiden an menschlichen Erythrozyten liegen viele Untersuchungen vor (42, 43, 48, 56, 58, 65, 76, 114, 126). Diese Zellart ist aber, da sie keinen Kern besitzt und somit nicht mehr teilungsfähig ist, als Modell nur bedingt brauchbar. Deshalb wurde diesmal eine andere Zellgruppe, wegen der leichten Verfügbarkeit wiederum eine Blutzelle, nämlich der Lymphozyt als Forschungsobjekt gewählt. Es wurde zunächst versucht, Messungen an einer möglichst reinen Lymphozytensuspension durchzuführen.

Die derzeit gebräuchlichste Methode, um Lymphozyten aus menschlichem Blut zu isolieren, ist die Ficoll-Isopaque-Zentrifugation nach Bøyum (14). In dieser grundlegenden Arbeit beschrieb Bøyum seine Versuche, die Lymphozyten von den Monozyten zu trennen, indem er die Dichte, Viskosität oder Osmolarität der Ficoll-Isopaque-Lösung veränderte. Er kam zu dem Schluß, daß eine Trennung dieser Zellen so nicht möglich ist, da Lymphozyten und Monozyten anscheinend eine ähnliche Dichte besitzen, die knapp unter 1,077 g/ml liegen dürfte. Bøyums Präparation enthielt durchschnittlich etwa 80 % Lymphozyten und 20 % Monozyten, was ja auch etwa dem Verhältnis im Blut entspricht. Die Granulozyten machten jeweils nur etwa 1 - 2 % aus. Neuere morphologische und funktionelle Studien haben ergeben, daß die nach Bøyums Methode gewonnenen Zellsuspensionen bis zu 40 % Monozyten enthalten können (113, 138).

Bøyum (14, 15) führte ferner an, daß durch Verdünnen des Blutes mit physiologischer Kochsalzlösung eine Ausbeute an mononukleären Zellen von annähernd 100 % erreicht werden könne. Er räumte jedoch selber ein, daß durch nachfolgende

Waschvorgänge ein Zellverlust möglich ist. Dies bestätigte auch Gmelig (67), der ebenfalls die Ficoll-Isopaque-Zentrifugation zur Zelltrennung verwendet hat, und damit zu einer Lymphozytenausbeute nach zwei Waschvorgängen von durchschnittlich etwa 60 % kam. Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Standardmethode, welche drei Waschzentrifugationen beinhaltete, führte zu einer Lymphozytenausbeute von 46 ± 16 % (s. 3.1.1.). Das Waschen der Zellpräparation ist vor allem auch deshalb nötig, um die Zahl der Thrombozyten zu reduzieren. Bei meinen Versuchen belief sich diese auf etwa 1 % der ursprünglich im Blut vorhandenen Thrombozytenzahl.

Eine weitgehend monozytenfreie Lymphozytenpräparation soll mit Baumwollsäulen erreicht werden können (84). Diese Methode hat jedoch einige Nachteile, weshalb sie in dieser Arbeit nicht verwendet wurde. Bevor die Zellsuspension auf die Säule aufgebracht werden kann, müssen die Erythrozyten durch eine Dichtegradientenzentrifugation aus dem Blut entfernt werden. Die Lymphozytenpräparation erfolgt also in zwei Schritten und dauert dadurch länger, was für die nachfolgenden Bindungsstudien nicht von Vorteil ist. Außerdem addieren sich die Zellverluste bei beiden Methoden, was die Ausbeute an Lymphozyten auf ein nicht mehr akzeptables Maß reduziert und die Zellzusammensetzung der Präparation noch variabler macht.

Eine weitere Methode zur Trennung von Lymphozyten und Monozyten beruht auf der Phagozytosefähigkeit der Monozyten. Bøyum (16) inkubierte eine Leukozytensuspension, die er durch Dextransedimentation oder Zentrifugation aus defibriniertem Blut gewonnen hatte, mit Eisenpartikeln vor. Bei der anschließenden Ficoll-Isopaque-Dichtegradientenzentrifugation sedimentierten dann die mit Eisen beladenen Monozyten. Durch dieses Vorgehen konnte Bøyum den Anteil der Monozyten von 21 % auf etwa 1 % reduzieren. Auch Melief (91) berichtete, daß er mit dieser Methode Lymphozytensuspensionen mit 95 - 100 % Lymphozyten gewinnen konnte. Andere Autoren konnten dieses gute Resultat nicht nachvollziehen. Rothbarth (113) etwa hatte nach Vorinkubation von heparinisiertem Blut mit Eisenkarbonyl und nach-

folgender Ficoll-Isopaque-Zentrifugation noch 21,7 % Monozyten in der Probe. Ein etwas besseres Ergebnis, nämlich 9,8 % Monozyten erzielte Rothbarth, wenn er erst nach der Dichtegradientenzentrifugation das Gemisch mononukleärer Zellen unter Hinzufügen von fetalem Kälberserum mit Eisenkarbonyl inkubierte und die eisenkarbonylhaltigen Zellen mit Hilfe eines Magneten entfernte. Noch kritischer sieht Gmelig (67) die Leukozytentrennung durch Inkubation mit Eisenkarbonyl vor Ficoll-Isopaque-Zentrifugation: Die Lymphozytenausbeute war nach Behandlung mit Eisenkarbonyl gewöhnlich geringer. Es ließ sich zwar eine merkliche, keineswegs aber vollständige Reduktion der Monozyten erreichen. Außerdem stellte Gmelig fest, daß diese Methode zu einem erheblichen Verlust von B-Zellen führte.

Leider war es nicht möglich, eine befriedigende und für meine Versuche geeignete Methode zur Trennung von Lymphozyten und Monozyten zu finden. Deshalb mußten die Messungen an einem Gemisch von hauptsächlich Lymphozyten und Monozyten, die wegen ihres unsegmentierten Kerns unter dem Begriff mononukleäre Zellen zusammengefaßt werden können, durchgeführt werden. Unter der Verwendung der Standardmethode enthielt die Zellsuspension bei 133 Messungen an 34 Normalpersonen durchschnittlich 76 ± 12 % Lymphozyten, 22 ± 12 % Monozyten und 0 - 3 % Granulozyten (s. 3.1.1.). Die Präparation beinhaltete außerdem eine relativ hohe Zahl an Erythrozyten, nämlich etwa 1-4 Erythrozyten pro Leukozyt. Diese beträchtliche Verunreinigung mit roten Blutzellen konnte jedoch in Kauf genommen werden, da Erdmann et al. (48) schon früher festgestellt hatten, daß ein Erythrozyt nur 228 ± 28 Rezeptoren für Ouabain besitzt. Die Zahl der Thrombozyten in der Lösung entsprach etwa der Zahl der Leukozyten. Thrombozyten haben aber weniger als 750 Bindungsstellen für Ouabain (19, 132), so daß auch die Bindung von ^3H -Ouabain an Blutplättchen vernachlässigt werden konnte.

Im folgenden soll nun die Morphologie und Funktion der Lymphozyten und Monozyten näher erläutert werden (für ausführlichere Informationen s. 9, 61, 81, 89, 108, 111, 137).

Der menschliche Organismus besitzt etwa eine Billion (10^{12}) Lymphozyten, die für die Immunabwehr verantwortlich sind. Die Lymphozyten im Blut entsprechen nur etwa 1 - 4 % aller Lymphozyten. Die übrigen befinden sich in den Lymphknoten, dem Knochenmark, dem Thymus und der Milz. Die Lymphozyten erreichen die meisten Gewebe über das Blutgefäßsystem, aus dem sie durch das Kapillarendothel in den interstitiellen Raum gelangen. Über das Lymphgefäßsystem werden sie dem Blutstrom wieder zugeführt. Die durchschnittliche Verweildauer der Lymphozyten im Blut beträgt nur etwa 20 Minuten. Aus dem oben Erwähnten geht hervor, daß der Lymphozyt eigentlich weniger eine Blut- als vielmehr eine Gewebszelle ist.

Die Lymphozytopoese ist noch nicht vollständig geklärt. Die Stammzellen der Lymphozyten kommen wahrscheinlich aus dem Knochenmark. In den lymphatischen Organen erfolgt die Proliferation und weitere Differenzierung der Zellen. Normalerweise werden nur etwa 1 - 2 % der Blutlymphozyten täglich neu gebildet.

Nach ihrer Funktion lassen sich zwei Hauptgruppen von Lymphozyten unterscheiden. Etwa die Hälfte der Lymphozytenvorstufen erhält im Thymus, wahrscheinlich unter dem Einfluß von Thymushormonen (Thymopoetin), die Fähigkeit, nach Kontakt mit einem Antigen zelluläre Abwehrmechanismen (delayed hypersensitivity, Allergie vom Spättyp) in Gang zu setzen. Diese Zellen werden deshalb T- (= Thymus-abhängige) Lymphozyten genannt. Die übrigen das Knochenmark verlassenden Lymphozyten werden in einem lymphatischen Organ, das bei Vögeln als Bursa Fabricii (nach dem italienischen Anatomen H. Fabricius, 1533 - 1619) bekannt ist, weiter geprägt und heißen deshalb B- (= Bursa-abhängige) Lymphozyten. Als Bursaäquivalente werden beim Menschen die sekundären Lymphorgane (Lymphknoten, Milz, Peyer-Plaques des Darmes, Tonsillen, Appendix, Milchflecken des Omentum majus) diskutiert. Neuerdings gibt es Hinweise dafür, daß die Prägung der Stammzellen zu B-Lymphozyten beim Menschen im Knochenmark selbst erfolgt. Das "B" könnte somit auch für "bone marrow" stehen (137).

Weitere Eigenschaften von T- und B-Lymphozyten sind in Tabelle 9 zusammengefaßt:

Tab. 9: Die wichtigsten Eigenschaften der T- und B-Lymphozyten

	T-Lymphocyten	B-Lymphocyten
Herkunft	primär: Knochenmark sekundär: Thymus	primär: Knochenmark sekundär: Keimzentren der Lymphknoten
Lebensdauer	Monate bis Jahre	2 Populationen: a) Tage bis Wochen b) Monate bis Jahre
Anteil am Pool der rezirkulierenden Lymphocyten	groß, über 60 %	kleiner
Vorkommen Lymphknoten	in der Tiefe der Rinde, perifollikulär	subcapsulär, medullär, Keimzentren
Milz	periarteriolar	periphere weiße Pulpa, rote Pulpa
PEYER'sche Plaques	perifollikulär	im Zentrum der Follikel
Funktionen Celluläre Immunmech.	++++	+ -
Humorale Immunmech.		
Induktion	+++	++++
Antikörpersynthese	-	++++
Immungedächtnis	++	+
Immuntoleranz	+	+
Differenzierungsmöglichkeit	Umwandlung in monocytoiden Formen unter der Einwirkung von Phytohämagglutinin	Positive Reaktion mit Fluoresceinisothiocyanatmarkiertem Antiserum gegen Immunglobuline

(Aus: Rick (111))

Der Tabelle ist zu entnehmen, daß die Lymphocyten auch bezüglich ihrer Lebensdauer keine einheitliche Population darstellen. 10 % der Lymphocyten im Blut, vorwiegend B-Zellen, sind kurzlebig mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von 5 Tagen. Die langlebenden, zirkulierenden Lymphocyten, hauptsächlich T-Zellen, haben eine durchschnittliche Lebenszeit von 500 Tagen. Bei einigen Lymphocyten wurde jedoch sogar eine Überlebenszeit von mehr als 20 Jahren gemessen.

Untersuchungen von Ritchie et al. (112) mit monoklonalen Antikörpern haben ergeben, daß die Anzahl der Lymphozyten der einzelnen Untergruppen im Blut erheblichen circadianen Schwankungen, die bis zu 59 % ausmachen können, unterliegt.

Da das Ziel dieser Arbeit darin bestand, Membranrezeptoren von intakten Zellen zu messen, ist es wichtig, die Oberfläche der Versuchszellen näher zu betrachten. T- und B-Lymphozyten lassen sich lichtmikroskopisch mit Hilfe der Standardfärbungen nicht unterscheiden. Die Rasterelektronenmikroskopie läßt eine Differenzierung zu: T-Lymphozyten haben eine relativ glatte Oberfläche, B-Lymphozyten hingegen besitzen diverse Zellausläufer (s. Abb. 12).

T- und B-Lymphozyten lassen sich auch dadurch unterscheiden, daß B-Zellen im Gegensatz zu T-Zellen Oberflächenimmunglobuline tragen. Ihr Nachweis gelingt mit direkter Immunfluoreszenz beziehungsweise Immunautoradiographie.

Der prozentuale Anteil der B-Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten liegt bei 20 %. Zur Trennung von T- und B-Lymphozyten sind die Gradientenmethoden nicht geeignet. Beide Zelltypen unterscheiden sich nur sehr wenig in Dichte und Größe. Sollen T- und B-Lymphozyten getrennt werden, verwendet man heute meist die Rosettenfraktionierung oder die Nylonfiltration. Friemel (61) schreibt, daß die Ergebnisse der Fraktionierung mittels Nylon sehr unterschiedlich angegeben werden. Die Ausbeute betrage meist nur etwa 25 - 50 % der eingegebenen Zellen. Bei Humanblutlymphozyten könne auch nur eine 50 %ige Eliminierung der IG-positiven Zellen durch die Säulenpassage erzielt werden. Es bindet auch stets neben den B-Lymphozyten und Makrophagen ein Teil der T-Lymphozyten an die Nylonwolle. Deshalb sind einige Arbeitsgruppen im Widerspruch zum Beispiel zu Julius und Mitarbeiter (77) der Auffassung, daß der hohe Reinheitsgrad der isolierten T-Lymphozyten den selektiven Verlust einer T-Subpopulation mit sich bringt.

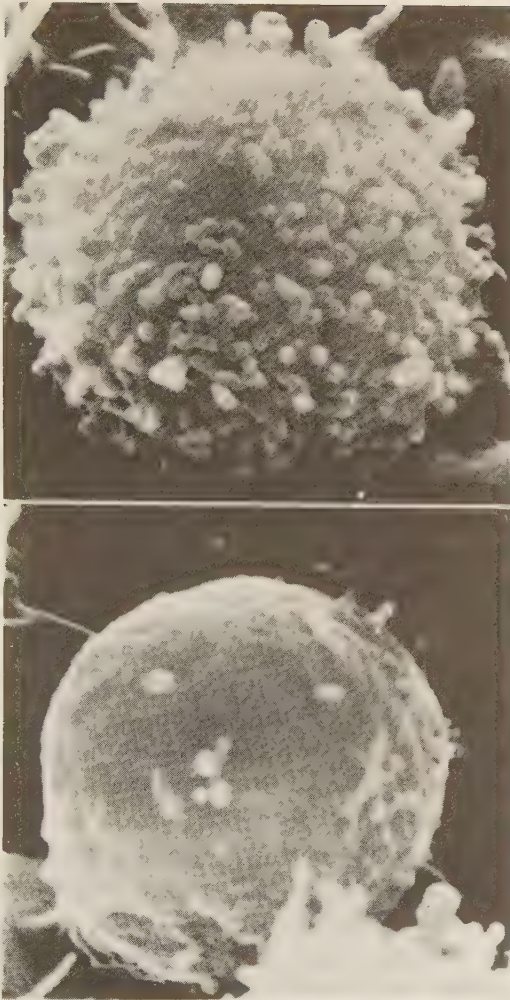


Abb. 12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von B- und T-Lymphozyten. Bei menschlichen B- (oben) und T-Lymphozyten (unten) sind Unterschiede erkennbar, die eine Bedeutung bei der Immunabwehr besitzen. B-Zellen erscheinen als komplexe Kugeln, die mit einer großen Zahl von Villi (fingerähnliche Ausläufer) besetzt sind, während T-Zellen relativ glatt sind und weitaus weniger Villi aufweisen. Diese Zellen besitzen einen Durchmesser von ungefähr 0,005 mm (Abbildungen nach Memorial Sloan-Kettering-Cancer-Center (aus Praxiskurier, 1973)).

(Aus: Löffler et al. (89))

In dieser Arbeit wurde die Zellfraktionierung mittels Nylon versucht, da anzunehmen ist, daß die große Schwankungsbreite der Zahl der Bindungsstellen für Ouabain pro Zelle durch den wechselnden Prozentsatz an Monozyten, aber auch an unterschiedlichen Lymphozytentypen bedingt ist. Es wurde deshalb erwartet, daß Messungen an einer fast reinen T-Lymphozytenpräparation konstantere Ergebnisse bringen würden. Leider konnten diese Untersuchungen wegen der zu geringen Zellausbeute dieser Methode nicht durchgeführt werden (s. 3.1.3.).

Neuere Untersuchungen haben ergeben, daß die Lymphozytenpopulation noch inhomogener ist als bisher angenommen wurde. Etwa 15 % der Gesamtlymphozytenzahl reagieren mit keiner der Nachweismethoden der B- und T-Lymphozyten; sie werden daher O-Zellen genannt. Weitere 3 - 4 % besitzen sowohl Eigenschaften von T- als auch von B-Zellen.

Nach Antigenkontakt differenzieren sich T-Lymphozyten zu sogenannten "Killer-Lymphozyten". Diese haben die Fähigkeit, fremde Zellen zu erkennen und mittels Lymphotoxinen zu vernichten. Die K-Lymphozyten sind morphologisch nicht von unstimulierten Lymphozyten zu unterscheiden. Außerdem gibt es noch sogenannte "Memory-Zellen". Diese sind Lymphozyten, die mit einem Antigen schon einmal in Berührung gekommen sind und ein immunologisches Gedächtnis für dieses Antigen besitzen, so daß eine Antikörperbildung bei erneutem Antigenkontakt sofort wieder erfolgen kann.

Die andere Zellart, die zu einem hohen Prozentsatz, nämlich 22 ± 12 %, in der Präparation anzutreffen war, ist der Monozyt. Monozyten haben einen Durchmesser von etwa 10 - 20 μm und einen großen, exzentrischen, oft nierenförmigen oder gelappten Kern. Die Zelle ist im fixierten Präparat rund oder oval und häufig unregelmäßig begrenzt. Das Zytoplasma ist schwach basophil. Monozyten werden im Knochenmark gebildet. Aus Promyelozyten entstehen Promonozyten, die sich zu Monozyten differenzieren. Im Knochenmark eines Erwachsenen umfaßt der

gesamte Monozytenpool etwa 6×10^8 Zellen/kg/KG, die Neuproduktion liegt bei 7×10^6 Zellen/kg/KG pro Tag und die Gefäßhalbwertszeit beträgt 4 bis 10 Stunden. Die Monozyten verlassen also bereits nach wenigen Stunden die Blutbahn, wohin sie auch nicht mehr zurückkehren. Im Gewebe differenzieren sie sich zu Makrophagen. Es gibt im menschlichen Körper etwa 50 mal so viele Gewebsmakrophagen wie Monozyten im Blut.

Makrophagen, Monozyten und Promonozyten werden ein und demselben System zugeordnet (62), weil ihnen eine ausgeprägte Phagozytose- und Pinozytoseaktivität, sowie eine starke Haftfähigkeit an Glasoberflächen gemeinsam ist. Monozyten und Makrophagen besitzen außerdem an der Zelloberfläche Rezeptoren für Immunglobuline und Komplement. Die Aufgabe des Monozyten-Makrophagen-Systems besteht also in der Abwehr von Mikroorganismen, der Beseitigung von organischem und anorganischem Material und der Zusammenarbeit mit den Lymphozyten bei immunologischen Reaktionen.

4.2. Charakterisierung von Hormonbindungsstellen menschlicher Blutzellen

Die Verfügbarkeit radioaktiv markierter Substanzen hat in den letzten Jahren einen wahren Boom von Bindungsstudien ausgelöst. Die Ergebnisse der diversen Arbeitsgruppen sind, was Bindungskapazität und Bindungskonstanten sowie den Einfluß verschiedener Pharmaka oder Krankheiten auf diese Größen betrifft, oft sehr widersprüchlich. Für Untersuchungen am Menschen benutzen viele Forscher wegen der leichten Handhabung Blutzellen und proklamieren diese als Modell für schwerer verfügbare innere Organe. Die Übertragbarkeit der so erhaltenen Daten, zum Beispiel von Messungen von β -adrenergen Substanzen auf das Herz, ist, wie später noch ausführlich zu berichten sein wird, fraglich.

Man muß sich auch darüber im klaren sein, daß nicht jede gemessene zellgebundene Radioaktivität einer Bindungsstelle,

nicht jede Bindungsstelle einem Rezeptor entspricht (s. Einleitung).

Ein Beispiel dafür liefern die Studien mit ^3H -Spiperon, einem Dopamin-Antagonisten. Bondy et al. (18) fanden an menschlichen Lymphozyten spezifische, hochaffine, stereoselektive Bindungsstellen nur an B-Lymphozyten. Maloteaux et al. (90) führten ebenfalls Untersuchungen mit ^3H -Spiperon an menschlichen Lymphozyten durch und kamen zu dem überraschenden Schluß, daß die von ihnen beobachtete Bindung an intakte Zellen nicht einem echten Rezeptor zugeordnet werden konnte. Es handelte sich vielmehr um ein "trapping phenomenon" des Liganden im Zellinnern. Nur so ließ sich nämlich erklären, daß die Bindung von ^3H -Spiperon geringer und nicht verdrängbar war, wenn an Stelle von intakten Zellen Membranpräparationen verwendet wurden.

Ein weiteres Problem zeigte sich bei Bindungsstudien mit ^{125}J -Insulin an menschlichen mononukleären Zellen. Archer et al. (6) verwendeten eine Leukozytensuspension, die sie nach der Methode von Bøyum (14) präpariert hatten, und fanden eine herabgesetzte Bindung von ^{125}J -Insulin bei übergewichtigen Patienten. Sie nahmen an, daß der Lymphozyt als vorherrschende Zelle im Inkubationsmedium für die Bindung von ^{125}J -Insulin verantwortlich war. Fast gleichzeitig jedoch hatten Schwartz et al. (123) erkannt, daß die Monozyten und nicht die Lymphozyten in der Präparation menschlicher mononukleärer Zellen das Insulin zu binden vermögen.

Studien mit Insulin sind auch ein gutes Beispiel dafür, daß die Verwendung einer Art von Blutzellen als Modell für Rezeptoränderungen innerer Organe leicht zu Fehlinterpretationen führen kann, da diese auf verschiedene Einflüsse unterschiedlich reagieren können. Der Sulfonylharnstoff Glibenclamid erhöht zwar die Bindungskapazität für Insulin von Monozyten, nicht aber von Erythrozyten (72).

Ein viel untersuchter Rezeptortyp an menschlichen Blutzellen ist der β -adrenerge Rezeptor (95). Das Vorhandensein von β -adrenergen Rezeptoren wurde wahrscheinlich durch den Nachweis von Adenylatcyclaseaktivität, welche auf Katecholamine in einer typischen β -adrenergen Weise reagierte (20). Williams et al. (134) waren die ersten, die β -adrenerge Rezeptoren an menschlichen mononukleären Leukozytenmembranen durch direkte Bindungsstudien mit $(-)^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol charakterisieren konnten (Daten von Bindungsstudien mit β -adrenergen Substanzen an menschlichen Leukozyten siehe Tabelle 10).

Landmann et al. (86) stellten fest, daß die maximale Bindungskapazität von intakten mononukleären Leukozyten von der Wahl des Radioliganden abhängt. Außerdem zeigten Messungen an Leukozytenmembranen, daß die Methode der Homogenisierung der Zellen ebenfalls die maximale Bindungskapazität beeinflusst. Brodde et al. (23) wiesen mit $(+)^{125}\text{J}$ -Cyanopindolol an Lymphozytenmembranen (Tab. 10) nach, daß menschliche Lymphozyten nur eine Art von β -adrenergen Rezeptoren besitzen. Aus den K_D -Werten für β_1 -selektive und β_2 -spezifische adrenerge Substanzen wurde ersichtlich, daß es sich um den β_2 -Typ handelt. Diese Erkenntnis relativiert die Aussagekraft der Ergebnisse von Bindungsstudien mit β -adrenergen Substanzen an Leukozyten, insbesondere bei kardialen Erkrankungen. Der linke Ventrikel besitzt nämlich etwa 86 % β_1 -spezifische Rezeptoren und nur etwa 14 % β_2 -spezifische (128). Aarons und Molinoff (1) dagegen glauben, daß Änderungen der β -adrenergen Rezeptordichte von Lymphozyten Änderungen an inneren Organen widerspiegeln, da sie an Ratten zeigen konnten, daß chronische Propranololgabe zu einem gleichsinnigen Anstieg der β -adrenergen Rezeptorenzahl an Herz, Lungen und Lymphozyten führte.

Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Krankheiten und Medikamente wie zum Beispiel Hypertonie (24, 39), Herzinsuffizienz (31), Asthma (94), Hyperthyreose (66, 135), Änderungen des Katecholaminspiegels durch Sympathomimetikagabe (31, 82, 94) oder körperliche Belastung (22) beziehungsweise Einnahme von β -Blockern (2, 60) sowie Kortikoideinnahme (36, 94) auf

Tab. 10: Charakterisierung des β -adrenergen Rezeptors menschlicher Leukozyten mit radioaktiv markierten Substanzen

Lit.- stelle	Versuche an:	Radioaktiv mark. Substanz	K_D (M)	Bindungs- stellen pro Zelle	Max. Bindungskap. (fmol/mg Protein)	Anmerkungen
(134)	Membranen von: 86 % Lymphozyten 12 % Monozyten <2 % PMNL	(-) ^3H -Dihydro- alprenolol	$1,0 \times 10^{-8}$	~ 2000	75 ± 12^a	Normalpersonen (n = 6)
(86)	Intakten MNL ^c	(-) ^3H -Dihydro- alprenolol	$2,7 \times 10^{-10}$	4700		23 °C, Normalpers. (n = 2)
		(+) ^{125}J -Cyano- pindolol	$3,1 \pm 0,3 \times 10^{-11}$	3730 ± 340		23 °C, Normalpers. (n = 6)
	Membranen von MNL	(+) ^{125}J -Cyano- pindolol	$1,2 \times 10^{-11}$		19,4	37 °C, Normalpers. (n = 1) Potter Homogenisator
			$1,0 \pm 0,2 \times 10^{-11}$		$15,7 \pm 2,3$	37 °C, Normalpers. (n = 4) Polytron Homogenisator
			$1,3 \times 10^{-11}$		8,4	37 °C, Normalpers. (n = 1) Ultrasonisation
(11)	Membranen von: 90-95 % B- u. T- Lymphozyten 5-10 % Monozyten	(-) ^3H -Dihydro- alprenolol	$1,46 \pm 1,3 \times 10^{-9}$		$51,1 \pm 5,1$	Normalpersonen (n = 2)
	Membranen von: ~ 90 % T-Lymphozyt. <0,01 % Monozyt.		$1,5 \pm 0,58 \times 10^{-9}$		$53,8 \pm 9,2$	Normalpersonen (n = 8)
	Membranen von: ~ 85 % B-Lymphozyt. ~ 12 % Monozyten		$1,4 \pm 0,32 \times 10^{-9}$		$51,8 \pm 10$	Normalpersonen (n = 8)

Lit.- stelle	Versuche an:	Radioaktiv mark. Substanz	K_D (M)	Bindungs- stellen pro Zelle	Max. Bindungskap. (fmol/mg Protein)	Anmerkungen
(125)	Membranen von: >90 % Lymphozyten	(-)- ³ H-Dihydro- alprenolol	$\sim 3 \times 10^{-8}$	~ 6000	682 $\pm$ 114 532 $\pm$ 132 1439 $\pm$ 83 220 $\pm$ 69	Lymphozytensuspension von Normalpers. (n = 8) T-Zell-angereicherte (89 %) Lymphozyten- suspens. von Normal- personen (n = 2) B-Zell-angereicherte (61 %) Lymphozyten- suspens. von Normal- personen (n = 2) Lymphozytensuspens. von Patienten mit CLL (n = 10)
(3)	Intakten Lymphozyten	(-)- ³ H-Dihydro- alprenolol	$\sim 1,0 \times 10^{-9}$	680 $\pm$ 47 801 $\pm$ 114		Normalpersonen (18-30 J., n = 37) Normalpersonen (60-72 J., n = 17) Kein altersabhängiger Unterschied!
(85)	Membranen von: 83 % Lymphozyten 13 % Monozyten	(-)- ³ H-Dihydro- alprenolol	6,0 $\pm$ 0,5 $\times 10^{-10}$		53 $\pm$ 4 67 $\pm$ 8	Normalpersonen (18-40 J., n = 14) Normalpersonen (53-60 J., n = 8)

Lit.- stelle	Versuche an:	Radioaktiv mark. Substanz	K_D (M)	Bindungs- stellen pro Zelle	Max. Bindungskap. (fmol/mg Protein)	Anmerkungen
(70)	Intakten Zellen: 70-85 % Lymphozyt. 15-30 % Monozyten	125 J-Jodcyano- pindolol	$1,06 \pm 0,076 \times 10^{-10}$	3250 ± 420		Normalpers. (n = 56) 31 P. 35 J. (21-35 J.) 25 P. 65 J. (68-79 J.) Kein Unterschied von Bmax und K_D zwischen Männern und Frauen. Keine Änderung mit dem Alter.
(121)	Membranen von: MNL, davon 83 % Lymphozyten	(-) 3 H-Dihydro- alprenolol	$\sim 2,0 \times 10^{-8}$	~ 14000 ~ 8000	$5,72 \pm 0,58 \times 10^5$ $3,32 \pm 0,48 \times 10^5$	Normalpersonen (24-41 J., n = 11) Normalpersonen (46-81 J., n = 12) Altersabh. Abnahme der Zahl der BS!
(39)	Membranen, davon 95 % Lymphozyten	3 H-Dihydro- alprenolol	$5,2 \pm 0,76 \times 10^{-9}$ $3,08 \pm 0,2 \times 10^{-9}$ $3,71 \pm 0,3 \times 10^{-9}$	703 ± 96 948 ± 108 1188 ± 75		Nabelvenenblut von ges. Neugeb. (n = 12) Normalpersonen (30 J., n = 13) Normalpersonen (60 J., n = 12) Normotoniker (18-85 J., n = 40) Patienten mit essent. Hypertonie (19-85 J., n = 26) Normotoniker: Maxi- mum der Rezeptoren- zahl mit 50 Jahren. Hypertoniker: Kein Maximum!

Lit.- stelle	Versuche an:	Radioaktiv mark. Substanz	K _D (M)	Bindungs- stellen pro Zelle	Max. Bindungskap. (fmol/mg Protein)	Anmerkungen
(24)	Intakten Lymphozyten	(+) ¹²⁵ J-Cyano- pindolol	~5,0 x 10 ⁻¹¹	774 + 49 (300 - 1500) s. 1037 + 22 (950 - 1150) s. 1424 + 72 (700 - 2700)	Normotoniker (20-81 J., x̄ = 36, n = 41) Pers. mit "border- line hypertension" (20-76 J., x̄ = 48, n = 9) Pat. mit manifester essent. Hypertonie (15-83 J., x̄ = 45, n = 45) Zunahme der BS mit an- steigendem arteriellen Mitteldruck! Normotoniker: Keine Altersabhängigkeit der Rezeptorenzahl. Hypertoniker: Schwach signifikante Zunahme mit dem Alter.	
(23)	Lymphozyten- membranen	(+) ¹²⁵ J-Cyano- pindolol	5,7 + 0,71 x 10 ⁻¹¹	943 + 71		Normalpersonen (22-26 J., n = 4)
(31)	Lymphozyten- membranen	³ H-Dihydro- alprenolol	nicht bestimmt	82 + 5 70 + 4 40 + 7		Normalpersonen (n = 9) Pat. mit chron. Herz- insuff. ohne sympatho- mimet. Med. (n = 11) Pat. mit HI nach 4 Wochen Pirbuterol- einnahme (n = 10)

Lit.- stelle	Versuche an:	Radioaktiv mark. Substanz	K_D (M)	Bindungs- stellen pro Zelle	Max. Bindungskap. (fmol/mg Protein)	Anmerkungen
(2)	Membranen von: 90 % Lymphozyt. 8 % Monozyten 2 % PMNL	125 J-Hydroxy- benzylpindolol	$5,3 \pm 0,5 \times 10^{-11}$		15,4 $\pm$ 0,9	Normalpersonen (23 - 33 J., $\bar{x} = 27$, $n = 12$) 43 + 4 % Anstieg der Rezeptorendichte nach 5 Tagen Propanolol- einnahme (160 mg/d)
(60)	Membranen, davon 80 % Lymphozyten	3 H-Dihydro- alprenolol	$1,78 \pm 0,36 \times 10^{-9}$ $2,41 \pm 0,7 \times 10^{-9}$		34,4 + 2,7 $\searrow$ s. 46,4 + 2,5 $\swarrow$	Normotoniker (22-38 J., $n = 22$) nach 4 Wo. Einnahme von Propanolol
	Membranen von PMNL	3 H-Dihydro- alprenolol	$1,44 \pm 0,15 \times 10^{-9}$ $3,16 \pm 1,12 \times 10^{-9}$		38,1 + 1,5 $\searrow$ s. 59,9 + 6,1 $\swarrow$	Normotoniker (22-38 J., $n = 22$) nach 4 Wo. Einnahme von Propanolol
(82)	Intakten Lymphozyten	(-) 3 H-Dihydro- alprenolol	$1,5 \times 10^{-9}$	2200 + 260 $\sim$ 2100		Normalpersonen (19-36 J., $n = 6$) nach 60minütiger Infusion von Iso- prenalin ($n = 6$)
(22)	Intakten Lymphozyten	125 J-Cyano- pindolol	$1,75 \pm 0,24 \times 10^{-11}$ $1,69 \pm 0,2 \times 10^{-11}$	926 + 72 $\searrow$ s. 1440 + 128 $\swarrow$		Normalpersonen in Ruhe (23-36 J., $n = 10$) nach 15 Min. Fahrrad- ergometertraining

t.- elle	Versuche an:	Radioaktiv mark. Substanz	K _D (M)	Bindungs- stellen pro Zelle	Max. Bindungskap. (fmol/mg Protein)	Anmerkungen
34)	Lymphozyten- membranen	¹²⁵ J-Hydroxy- benzylpindolol	$1,54 \pm 0,34 \times 10^{-10}$ $1,18 \pm 0,37 \times 10^{-10}$ $1,08 \pm 0,37 \times 10^{-10}$ $0,81 \pm 0,20 \times 10^{-10}$ $1,30 \pm 0,40 \times 10^{-10}$	1146 ± 98 845 ± 114 582 ± 47 619 ± 71 551 ± 60 1348 ± 139 782 ± 100	$s.$ $s.$ $s.$ $s.$	Normalpersonen (24-68 J., $\bar{x} = 38$, $n = 11$) Astmatiker ohne Med. (16-54 J., $\bar{x} = 35$, $n = 8$) Astmatiker mit β -Sympathomimetika: (16-60 J., $\bar{x} = 37$, $n = 11$) a) ohne zusätzliche Medikamente ($n = 5$) b) und zusätzliche Prednisolon ($n = 6$) Normalpersonen: a) vor Terbutalinein- nahme ($n = 4$) b) nach 1wöchiger Terbutalineinnahme ($n = 4$)
36)	Membranen, davon 98 % PMNL Membranen, davon 85-90% MNL	³ H-Dihydro- alprenolol	$5,72 \pm 0,34 \times 10^{-10}$ $(n = 84)$ $5,81 \pm 0,30 \times 10^{-10}$ $(n = 82)$ $7,4 \pm 1,9 \times 10^{-10}$ $6,8 \pm 1,5 \times 10^{-10}$ $1,27 \pm 0,65 \times 10^{-9}$ $5,1 \pm 0,69 \times 10^{-10}$	476 ± 23 $(n = 79)$ 493 ± 23 $(n = 70)$ $46,6 \pm 4,9$ $29,6 \pm 3,9$ $40,7 \pm 6,0$ $50,3 \pm 6,8$	$s.$ $s.$ $s.$ $s.$ $s.$ $s.$ $s.$	84 Messungen an 62 Normalpersonen (18 - 32 J.) 84 Messungen an 62 Normalpersonen (18 - 32 J.) Normalpersonen ($n = 15$) 4 Std. nach Einnahme von Cortisonacetat Normalpersonen ($n = 8$) 24 Std. nach Einnahme von Cortisonacetat

Lit.- stelle	Versuche an:	Radioaktiv mark. Substanz	K_D (M)	Bindungs- stellen pro Zelle	Max. Bindungskap. (fmol/mg Protein)	Anmerkungen
(135)	Lymphozyten- membranen	(-)- ³ H-Dihydro- alprenolol	nicht bestimmt	nicht bestimmt		Max. Bindung von ³ H-DHA (10 nM und 40 nM) bei hyperthyreoten Patienten u. euthyreoten Personen gleich
(66)	Intakten MNL	(-)- ³ H-Dihydro- alprenolol	1,1 ± 0,2 x 10 ⁻⁹ 1,1 ± 0,3 x 10 ⁻⁹	967 ± 134 2250 ± 387 s.	25 ± 3 57 ± 9 s.	Normalpersonen (n = 12) nach 7-tägiger Tri- jodthyronineinnahme (n = 12)
(63)	Membranen von: ~90 % PMNL <5 % Lymphozyt.	(-)- ³ H-Dihydro- alprenolol	1,1 ± 0,1 x 10 ⁻⁹	870 ± 40	24,6 ± 1,1	Normalpersonen (n = 10)

) Alle in der Tabelle angegebenen Daten entsprechen Mittelwert ± Standardfehler
) PMNL = Polymorphonukleäre Leukozyten
) MNL = Mononukleäre Leukozyten
) s. = signifikant

die Zahl und das Bindungsverhalten β -adrenerger Rezeptoren menschlicher mononukleärer Leukozyten führten meist zu gegensätzlichen Ergebnissen (genaue Daten s. Tab. 10). Unklar ist sogar, ob B- und T-Lymphozyten gleichviel β -adrenerge Rezeptoren besitzen (11, 125) und ob sich die Rezeptorzahl mit dem Lebensalter ändert (3, 24, 39, 70, 85, 121).

Der β -adrenerge Rezeptor wurde auch an anderen Blutzellen charakterisiert (21, 36, 63, 115). An Thrombozyten wurden β -adrenerge Rezeptoren durch Bindungsstudien bisher nicht identifiziert, obgleich Jakobs et al. (75) eine β -adrenerge Stimulation der Adenylatcyclase beobachteten. Besser charakterisiert an Thrombozyten ist der α_2 -adrenerge Rezeptor (34, 73, 96, 97).

An Lymphozyten wurden noch weitere spezifische Rezeptoren für Hormone beschrieben: Rezeptoren für das menschliche Wachstumshormon (87), das vasoaktive intestinale Polypeptid (35), ein peripherer Typ des Benzodiazepinrezeptors (92) sowie cholinerge Muskarinrezeptoren (10).

4.3. Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Herzglykosiden

4.3.1. Bindung von Herzglykosiden an Herzmuskelzellmembranen verschiedener Spezies

Bei der Beschäftigung mit positiv inotropen Substanzen interessieren natürlich am meisten die Untersuchungen am Herzmuskel selbst. Es wurden viele Messungen an Tieren, jedoch verständlicherweise relativ wenige an menschlichem Herzmuskelgewebe durchgeführt. Es zeigten sich beträchtliche Unterschiede in der Affinität für Ouabain der Herzmuskelpräparationen der verschiedenen Spezies. Die Dissoziationskonstanten und Geschwindigkeitskonstanten der ^3H -Ouabain-Rezeptor-Bindung an Herzmuskelzellmembranen einiger Spezies sind in Tab. 11 zusammengestellt. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten liegen für alle Spezies etwa im selben Bereich ($1,1 \times 10^4 - 1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$), die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten unterscheiden sich deutlich ($1 \times 10^{-2} - 6,6 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$). Anscheinend wird die Empfindlichkeit gegenüber Ouabain der einzelnen Spezies hauptsächlich durch die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante bestimmt.

Wie aus der Tabelle 11 ersichtlich, ist die für Ouabain am wenigsten sensitive Spezies die Ratte. Erdmann et al. (51) fanden an Rattenherzmuskelzellmembranen zwei Bindungsstellen, wobei nur die niederaffine Bindungsstelle mit einer Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ gekoppelt war. Bei schlagenden Ventrikelstreifen war die hochaffine Bindungsstelle mit der positiven Inotropie korreliert. Eine 100fach höhere Ouabainkonzentration war nötig, um die $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme, ein Maß für die Natriumpumpe an schlagenden Zellen, zu hemmen.

Spezies mit hoher Affinität für Ouabain (Mensch, Katze, Hund, Rind, Schaf) zeigen jedoch an Herzmuskelzellmembranen stets nur eine Art von Rezeptor, der mit der Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ korreliert ist.

Tab. 11: Geschwindigkeitskonstanten und Dissoziationskonstanten der ^3H -Ouabain-Rezeptor-Bindung an Herzmuskelzellmembranen verschiedener Spezies

Lit.- stelle	Spezies	Assoz. geschw. konst., k_{+1} ($\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$)	Dissoz. geschw. konst., k_{-1} (sec^{-1})	Dissoziat. konst., K_D k_{-1}/k_{+1} (M)	Dissoziat. konst., K_D nach Scatchard (116)	Dissoziat. konst., K_D (M) nach Woolf (80)
(53)	Rind	$3,61 \times 10^4$	$0,99 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^{-9}$	$3,1 \times 10^{-9}$	
	Hund	$5,45 \times 10^4$	$2,31 \times 10^{-4}$	$4,2 \times 10^{-9}$	$4,3 \times 10^{-9}$	
(51)	Ratte	$4,3 \times 10^4$	1×10^{-2} (6×10^{-4})	$2,3 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-7}$ $2,8 \times 10^{-5}$	
(45)	Mensch	$1,2 \times 10^5$	$3,0 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-9}$		
	Schaf	$1,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-9}$		
	Meersch.	$5,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-7}$		
	Frosch	$2,3 \times 10^4$	$6,6 \times 10^{-5}$	$3,3 \times 10^{-9}$		
	Katze			$6,3 \times 10^{-9}$		
(25)	Mensch	$1,2 + 0,1^a) \times 10^5$ ($n = 4$)	$2,3 + 0,2 \times 10^{-4}$ ($n = 4$)	$1,9 \times 10^{-9}$	$3,7 + 0,2 \times 10^{-9}$ ($n = 18$)	$3,8 + 0,3 \times 10^{-9}$ ($n = 18$)
	Katze	$1,2 + 0,1 \times 10^5$ ($n = 4$)	$1,9 + 0,2 \times 10^{-4}$ ($n = 3$)	$1,6 \times 10^{-9}$	$4,2 + 0,2 \times 10^{-9}$ ($n = 19$)	$4,3 + 0,2 \times 10^{-9}$ ($n = 19$)
	Rind	$1,0 + 0,1 \times 10^5$ ($n = 5$)	$1,2 + 0,1 \times 10^{-4}$ ($n = 4$)	$1,2 \times 10^{-9}$	$2,7 + 0,1 \times 10^{-9}$ ($n = 69$)	$2,8 + 0,1 \times 10^{-9}$ ($n = 69$)

a) Mittelwert + Standardfehler

Der linke Ventrikel des menschlichen Herzens besitzt etwa $1,5 \times 10^{14}$ Bindungsstellen/g Feuchtgewicht, der rechte Ventrikel etwa $0,9 \times 10^{14}$ (47), was ungefähr 1000 Rezeptoren/ μm^2 Zelloberfläche entspricht (44).

Brown und Erdmann (25) zeigten, daß die Geschwindigkeitskonstanten für Ouabain (s. Tab. 11) und andere Herzglykoside an Herzmuskelzellmembranen von Katze und Mensch sehr ähnlich sind. Das Katzenherz scheint demzufolge ein gut geeignetes Modell für die Wirkungen von Herzglykosiden am menschlichen Herzen zu sein.

4.3.2. Bindung von Herzglykosiden an menschliche solide Gewebe

Es liegen einige wenige Untersuchungen des Bindungsverhaltens von ^3H -Ouabain an menschlichen soliden Geweben vor. Die Ergebnisse sind in Tab. 12 gezeigt. Man sieht, daß, obwohl alle Autoren nur eine Art von Bindungsstellen finden, die Bindung von ^3H -Ouabain an Herzmuskelzellmembranen mit höherer Affinität erfolgt als an Skelettmuskelzellmembranen, wohingegen die maximale Bindungskapazität dieser beiden Muskeltypen gleich groß ist. Die Dissoziationskonstante der Bindung von ^3H -Ouabain an Dickdarmschleimhaut ist der am Herzmuskel vergleichbar.

4.3.3. Bindung von Herzglykosiden an menschliche Erythrozyten

Ein leichter zugängliches, häufig verwendetes menschliches Modell ist der Erythrozyt. Die Angaben über die Zahl der Herzglykosidrezeptoren pro Erythrozyt variieren zwischen etwa 220 (48, 56), 250 (40), 400 - 500 (76), etwa 1100 (65) und 1200 (64) (s. Tab. 13). Erdmann und Hasse (48) berechneten eine Dissoziationskonstante der Glykosidrezeptorbindung von

Tab. 12: Dissoziationskonstanten und maximale Bindungskapazitäten für ^3H -Ouabain verschiedener menschlicher Gewebe

Lit.- stelle	Gewebeart	Dissoziat.		Max. Bindungs- kapazität
		konst., K_D k_{-1}/k_{+1} (M)	Dissoziat.konst., K_D (M) nach Scatchard (116)	
(45)	Herzmuskel	$2,5 \times 10^{-9}$		$1,5 \times 10^{11}$ BS/mg Feuchtgewicht
(25)	Herzmuskel	$1,9 \times 10^{-9}$	$3,7 \pm 0,2 \times 10^{-9}$ a) (n = 18)	
(38)	Skelettmuskel		$6,0 \times 10^{-7}$	$4,8 \pm 0,8 \times 10^{11}$ BS/mg Protein (n = 8)
(101)	Skelettmuskel: M. vastus lat.		$1,9 \times 10^{-8}$	$1,67 \pm 0,09 \times 10^{11}$ BS/mg Feuchtgewicht (n = 20)
	Interkostal- muskulatur			$1,52 \times 10^{11}$ BS/mg Feuchtgewicht (n = 3)
	M. rectus abdominis			$1,59 \times 10^{11}$ BS/mg Feuchtgewicht (n = 3)
(5)	Dickdarm- schleimhaut		$1,9 \pm 0,2 \times 10^{-9}$	$7,5 \pm 0,8 \times 10^{11}$ BS/mg Protein (n = 17)

a) Alle in der Tabelle angegebenen Daten entsprechen Mittelwert + Standardfehler

$2,8 \times 10^{-9}$ M, was ungefähr den am menschlichen Herzen gefundenen Werten entspricht (s. Tab. 12). Sowohl die Zahl der Glykosidrezeptoren als auch die Affinität für das Glykosid waren unabhängig vom Alter und vom Geschlecht des Blutspenders (48). Schmalzing et al. (119) hingegen fanden eine signifikant niedrigere Zahl der Bindungsstellen für Ouabain bei Frauen älter als 40 Jahre im Vergleich zu jungen Frauen. Über eine Altersabhängigkeit bei Männern konnten sie wegen zu geringer Fallzahlen keine Aussage treffen.

Änderungen des Ionenmilieus sowie einige Krankheiten variieren die Zahl der Herzglykosidrezeptoren von Erythrozyten. Bei adipösen Patienten war die Natriumkonzentration in den Erythrozyten erhöht und die maximale Bindungskapazität für Ouabain erniedrigt (37). Bei chronischer Hypokaliämie unterschiedlicher Ursache wurden signifikant mehr Rezeptoren gemessen (49, 50, 120). Ein Anstieg der Rezeptorenzahl fand sich auch bei Patienten mit essentieller Hypertonie und diuretischer Behandlung ohne Hypokaliämie, Thalassaemia minor und Bartter's Syndrom (50). Die Dissoziationskonstanten waren bei keiner dieser Krankheiten signifikant verändert. Auch die Einnahme von Glucocorticoiden führte zu einer erhöhten Zahl der Bindungsstellen für Ouabain (78).

Bei Personen mit unbehandelter essentieller Hypertonie unterschied sich die Rezeptorenzahl nicht von normalen Kontrollen (55). Ford et al. (59) fanden eine schwach erniedrigte Bindung von ^3H -Digoxin bei 38 Patienten am Beginn der Digoxineinnahme (2 - 10 Tage nach Digitalisierung). Die Werte von 46 Patienten, die schon länger als 2 Monate Digoxin eingenommen hatten, unterschieden sich nicht von denen bei der Kontrollgruppe. Erdmann et al. (56) fanden bei 13 Patienten, die nur mit Herzglykosiden therapiert wurden, signifikant mehr Ouabainbindungsstellen. Sie glauben jedoch, daß dieser Unterschied nur auf einer großen Variation zwischen verschiedenen Individuen beruht und somit ohne klinische Bedeutung ist, da sich die Werte in einem weiten Bereich überlappen, und, da sie bei 3 Normalpersonen nach 3monatiger Einnahme von Digoxin keine

Tab. 13: Charakterisierung der Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche Erythrozyten

Lit.- stelle	Versuche an:	Ass.geschw. konst., k_{+1} ($\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$)	Diss.geschw. konst., k_{-1} (sec^{-1})	Diss.konst., K_D , k_{-1}/k_{+1} (M)	Diss.konst., K_D (M) nach Scatchard (116)	Max.Bindungs- kapazität (BS/Zelle)	Anmerkungen
(64) Intakten Erythrozyten					$6,3 \times 10^{-9}$	1200	
(65) Intakten Erythrozyten						1100	
(48) Erythrozyten- membranen		$4,6 \times 10^4$	$1,4 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-9}$	$2,8 \pm 0,5 \times 10^{-9} \text{ a)}$	228 ± 28	Normalpersonen (18 - 88 J., $n = 31$)
(76) Intakten Erythrozyten						470 ± 73	Normalpersonen ($n = 6$)
(119) Intakten Erythrozyten					$2,8 \pm 0,2 \times 10^{-9}$ ($n = 73$)	453 ± 104	
(133) Intakten Erythrozyten						362 ± 69	Normalpersonen ($n = 7$), 1 % Retikulozyten
Intakten Retikulozyten						~ 4000	Patienten mit Retikulozytose von 4 - 20 % ($n = 8$)

a) Alle in der Tabelle angegebenen Daten entsprechen Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

Änderung der Rezeptorenzahl zeigen konnten. Signifikant erhöht war die Zahl der Bindungsstellen für Ouabain bei 34 Patienten, die Digitalis und Diuretika einnahmen, was demzufolge auf die durch die Diuretika bedingte Hypokaliämie zurückzuführen ist.

4.3.4. Bindung von Herzglykosiden an menschliche mononukleäre Leukozyten

Meine Experimente sowie die Ergebnisse anderer Untersucher haben gezeigt, daß die Bindung von Herzglykosiden an menschliche Lymphozyten, besser mononukleäre Leukozyten, da der Anteil der Monozyten in der Suspension meist nicht unerheblich ist, sättigbar ist und nur an eine Art von Rezeptor mit hoher Affinität erfolgt (s. 3.2.). Assoziation und Dissoziation sind relativ langsame Prozesse (3.2.2., 3.2.3.). Die Bindung der Herzglykoside wird durch Kalium kompetitiv gehemmt.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die durch Bindungsstudien erhaltenen Daten auszuwerten. In der vorliegenden Arbeit wurde der Scatchard Plot verwendet, um die Dissoziationskonstante und die maximale Bindungskapazität für ^3H -Ouabain zu berechnen (2.5.3.). Keightley und Cressie (80) berichteten, daß der Woolf Plot bei der Analyse der Daten der Bindungsstudien zuverlässiger sei als der Scatchard Plot. Deshalb wurden die Ergebnisse wiederholter Messungen an mononukleären Leukozyten dreier Normalpersonen vergleichsweise auch nach Woolf ausgewertet (3.3.2.). Bei der Berechnung der maximalen Bindungskapazität fand sich bei allen drei Personen kein signifikanter Unterschied, die Dissoziationskonstante unterschied sich nur bei einer Person (Scatchard Plot: $3,21 \pm 1,15 \times 10^{-9}$ M, Woolf Plot: $3,49 \pm 1,50 \times 10^{-9}$ M, $p = 0,038$, $n = 17$), was in Anbetracht des großen s-Bereiches eher irrelevant erscheint. Auch der Vergleich zwischen Scatchard Plot und Woolf Plot an Herzmuskelzellmembranen zeigte keinen Unterschied (25), s. Tab. 11.

Die Bindungsstudien mit ^3H -Ouabain an menschlichen mononukleären Leukozyten verschiedener Untersucher führten zu recht unterschiedlichen Ergebnissen (s. Tab. 14). Die Rezeptorenzahl pro Zelle bei Normalpersonen reicht von 29900 (102) bis 189000 (7), die für die Dissoziationskonstante angegebenen, durch Scatchard Plot ermittelten Werte variieren zwischen $2,0 \times 10^{-9}$ M (19) und $1,15 \times 10^{-7}$ M (132). Die Angaben lassen sich jedoch nur schlecht vergleichen, da fast jede Arbeitsgruppe eine etwas andere Präparationsmethode und ein unterschiedliches Inkubationsmedium benutzt, und vor allem, da der prozentuale Anteil der einzelnen Leukozytenarten in der Zellsuspension sehr different ist. B- und T-Lymphozyten scheinen etwa dieselbe Bindungskapazität zu besitzen. Wiley et al. (132) berichten, daß die B-Zell-angereicherten Lymphozyten von Blut von Normalpersonen dasselbe Bindungsverhalten gegenüber Ouabain zeigen wie die T-Zell-reiche Standardpräparation. Monozyten hingegen scheinen sehr viel mehr Ouabain zu binden. Die Autoren bestimmten bei einem Patienten mit Monozytose und Leukopenie, wobei 89 % der Zellen in der Inkubationslösung Monozyten waren, die Rezeptorenzahl pro Zelle mit 130000. Nun kann man einwenden, daß die Zellen bei diesem Patienten krankheitsbedingt verändert sein könnten und deshalb die Aussagekraft dieses Versuches limitiert ist. Wiley et al. (132) zeigten jedoch ferner, daß Vorinkubation mit Eisenkarbonyl den Anteil der Monozyten in der Suspension mononukleärer Zellen von etwa 11,5 % auf circa 3 % reduzierte und dies die maximale Zahl der Bindungsstellen für Ouabain im Mittel um 9050 Bindungsstellen pro Zelle herabsetzte. Auch daraus schlossen sie, daß Monozyten ein Mehrfaches der Bindungsstellen für Ouabain von Lymphozyten besitzen. Diese Überlegungen sind im Einklang mit Pedersen und Klitgaard (106), die bei einer Suspension mononukleärer Zellen mit 2 % Monozyten 45700 Rezeptoren fanden, einer Präparation mit 12 % Monozyten jedoch 75500 (s. Tab. 14). Meine Beobachtungen ließen hingegen keine Abhängigkeit zwischen Prozent Monozyten und Zahl der Bindungsstellen pro Zelle erkennen (s. 3.3.1., Abb. 5). Man sieht ferner, daß die Zellen, die als Verunreinigung in der Präparation vorkommen, Ouabain in sehr unterschiedlichem Maß zu binden vermögen

Tab. 14: Charakterisierung der Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten

Lit.- stelle	Versuche an:	Ass.geschw. konst., k_{+1} ($\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$)	Diss.geschw. konst., k_{-1} (sec^{-1})	Diss.konst., k_{-1}/k_{+1} (M)	Diss.konst., K_D nach Scatchard (116) (M)	Max.Bindungs- kapazität (BS/Zelle)	Anmerkungen
(107)	Lymphozyten in Kultur	$1,4 \times 10^3$	$4,7 \times 10^{-6}$	$3,3 \times 10^{-9}$		125000	n = 4
(132)	Intakten Lymphozyten: ~95% Lymphoz. ~3% Monozyt. >99% Lymphoz.				$1,15 \times 10^{-7}$	44200 ± 9920^a	Normalpersonen [†] (n = 10) 4mM K ⁺ im Inkubationsmedium
	MNL ^{c)} , davon 89 % Monozyten				$1,16 \times 10^{-7}$	29200 ± 8370	Patienten mit CLL (n = 8)
					$1,25 \times 10^{-7}$	130000	1 Patient mit Monozytose und Lymphopenie
	Neutrophilen Granulozyten				$7,7 \times 10^{-8}$	53600 ± 16450	
	Erythrozyten					362 ± 69	Normalpersonen (n = 7)
	Thrombozyten				$5,9 \times 10^{-9}$	742 ± 48	
(30)	Intakten Lymphozyten					48381 ± 15026	Normalpersonen (n = 5)
						57104 ± 8144	Patienten mit hyperkaliämischer periodischer Para- lyse im anfalls- freien Intervall

Lit.- stelle	Versuche an:	Ass.geschw. konst., k_{+1} ($M^{-1} sec^{-1}$)	Diss.geschw. konst., k_{-1} (sec^{-1})	Diss.konst., k_{-1}/k_{+1} (M)	Diss.konst., K_D nach Scatchard (116) (M)	Max.Bindungs- kapazität (BS/Zelle)	Anmerkungen
(7)	Intakten Lymphozyten				$6,8 \pm 4,0 \times 10^{-8}$ ($n = 11$)	189000 ± 67700	Normalpers. ($n = 14$) 5 mM K^+ im Inkub. Medium, Hypothyreote Patient. ($n = 14$)
(98)	Intakten Lymphozyten					32400^b 49600 $\searrow$ s.	Normalpers. ($n = 9$) Pers. mit "border- line hypertension" ($n = 9$)
(105)	Intakten Leukozyten 94% Lymphoz. 2% Monozyt. 3% NG	$3,08 \pm 0,34 \times 10^4$ ($n = 6$)	$1,58 \pm 0,5 \times 10^{-4}$ ($n = 6$)	$5,12 \times 10^{-9}$	$6,75 \pm 2,07 \times 10^{-9}$ ($n = 13$)	43154 ± 8037 ($n = 25$)	Normalpersonen
	Intakten Leukozyten: 80% Lymphoz. 16% Monozyt. 4% NG				$6,31 \pm 1,23 \times 10^{-9}$ ($n = 6$)	75474 ± 6764 ($n = 9$)	

Lit.- stelle	Versuche an:	Ass.geschw. konst., k_{+1} ($M^{-1} \text{ sec}^{-1}$)	Diss.geschw. konst., k_{-1} (sec^{-1})	Diss.konst., k_{-1}/k_{+1} (M)	Diss.konst., K_D nach Scatchard (116) (M)	Max.Bindungs- kapazität (BS/Zelle)	Anmerkungen
(106)	Intakten Leukozyten 94% Lymphoz. 2% Monozyt. 3% NG	$3,15 \pm 0,36$ $\times 10^4$ (n = 5) s. $\swarrow$	$1,77 \pm 0,39$ $\times 10^{-4}$ (n = 5) $\swarrow$	$5,62 \times 10^{-9}$ $\swarrow$	$7,9 \pm 2,6$ $\times 10^{-9}$ (n = 8) s. $\swarrow$	45700 ± 9400 (n = 8)	Normalpersonen
		$2,01 \pm 0,37$ $\times 10^4$ (n = 5)	$1,73 \pm 0,21$ $\times 10^{-4}$ (n = 5)	$8,61 \times 10^{-9}$ $\swarrow$	$1,56 \pm 0,74$ $\times 10^{-8}$ (n = 8) s. $\swarrow$	44900 ± 7100 (n = 8)	Inkubationsmedium mit Chinidin (10^{-5} M)
	Intakten Leukozyten: 80% Lymphoz. 16% Monozyt. 4% NG				$5,7 \pm 1,0$ $\times 10^{-9}$ s. $\swarrow$	75500 ± 7300 (n = 8)	Normalpersonen
(102)	Intakten Lymphozyten				$8,3 \pm 1,2$ $\times 10^{-9}$ s. $\swarrow$	79700 ± 8800 (n = 8)	Inkubationsmedium mit Chinidin (10^{-5} M) (n = 8)
						29934 ± 3554 (n = 19)	Normalpersonen
(19)	Intakten MNL, davon 82 % Lymphozyten	$2,2 \times 10^4$	$2,6 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-9}$ $\swarrow$	$1,96 \pm 0,42$ $\times 10^{-9}$ s. $\swarrow$	35712 ± 6986 (n = 8)	Normalpers. (n = 8) Zelltrennung mit Percoll
		$1,8 \times 10^4$	$2,8 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-9}$ $\swarrow$	$2,39 \pm 0,51$ $\times 10^{-9}$ s. $\swarrow$	39987 ± 8009 (n = 16)	Normalpers. (n = 16) Zelltrennung mit Ficoll
	Intakten PMNL	$2,4 \times 10^4$	$2,4 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-9}$ $\swarrow$	$2,4 \pm 0,7$ $\times 10^{-9}$ s. $\swarrow$	20415 ± 3616 (n = 8)	Normalpers. (n = 8) Zelltrennung mit Percoll

Lit.- stelle	Versuche an:	Ass.geschw. konst., k_{+1} ($M^{-1} \text{sec}^{-1}$)	Diss.geschw. konst., k_{-1} (sec^{-1})	Diss.konst., k_{-1}/k_{+1} (M)	Diss.konst., K_D nach Scatchard (116) (M)	Max.Bindungs- kapazität (BS/Zelle)	Anmerkungen
(f)	Intakten MNL, davon 76 % Lymphozyten				$2,8 \pm 1,2$ $\times 10^{-9}$	34600 ± 9700	133 Messungen an 34 Normalpersonen
	89% Lymphoz.	$2,7 \times 10^4$	$7,9 \times 10^{-5}$	$2,9 \times 10^{-9}$	$1,9 \times 10^{-9}$	38400	Normalperson, 55 J.
	63% Lymphoz.	$5,0 \times 10^4$	$8,2 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-9}$	$1,9 \times 10^{-9}$	24200	Normalperson, 29 J.

- a) Alle in der Tabelle angegebenen Daten entsprechen Mittelwert $\pm$ Standardabweichung
b) Medianwerte, s. = signifikant
c) MNL = Mononukleäre Leukozyten
d) PMNL = Polymorphonukleäre Leukozyten
e) NG = Neutrophile Granulozyten
f) Ergebnisse dieser Arbeit (s. Kapitel 3)

(s. Tab. 14). Polymorphonukleäre Leukozyten haben eine Bindungskapazität, die der der Lymphozyten vergleichbar ist (19, 132), Erythrozyten und Thrombozyten sind eher vernachlässigbar (48, 132).

Vergleicht man meine 133 Messungen an 34 Normalpersonen mit den Angaben anderer Arbeitsgruppen, so liegt der Wert für die Dissoziationskonstante mit $2,8 \pm 1,2 \times 10^{-9}$ M im selben Bereich wie bei Quastel und Kaplan (107), Pedersen und Klitgaard (105, 106) und Boon et al. (19). An menschlichem Herzmuskelgewebe und an Erythrozyten wurden ähnliche Werte gefunden (s. Tab. 12, 13 und 14). Wiley et al. (132) und Arnott et al. (7) fanden höhere K_D -Werte für Lymphozyten, was zum Teil daher kommt, daß sie als einzige der in der Tabelle angeführten Autoren für ihre Bindungsstudien ein kaliumhaltiges Inkubationsmedium verwendeten (Werte in Tab. 14). Ob das Kalium allein allerdings als Erklärung für einen Unterschied von einer (7) beziehungsweise von zwei (132) Zehnerpotenzen ausreicht, ist fraglich. Weder Wiley et al. (132) noch Arnott et al. (7) überprüften ihre durch Bindungsstudien ermittelten Werte für die Dissoziationskonstante durch kinetische Experimente. Meine zeitabhängigen Bindungsversuche zeigten, daß sich etwa nach 3 Stunden ein Äquilibrium einstellt, Boon et al. (19) meinen, daß es erst nach etwa 6 Stunden erreicht ist. Daher ergeben sich Zweifel, ob Arnott et al. (7), die eine Inkubationszeit von nur 1,5 Stunden verwendeten, ihre Messungen wirklich unter Gleichgewichtsbedingungen vornahmen.

Meine Werte für die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten liegen im selben Größenbereich wie bei Boon et al. (19). Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante von Pedersen und Klitgaard (105, 106) unterscheidet sich zwar um den Faktor 10, aber sie kommen auch auf eine Dissoziationskonstante im nM-Bereich. Noch differenter sind die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten von Quastel und Kaplan (107), doch auch deren Dissoziationskonstante hat die Größenordnung nM. Anscheinend ist die Bindungsgeschwindigkeit von kultivierten Lymphozyten verändert, die Affinität jedoch dieselbe.

Unter Berücksichtigung des großen Bereiches für die Standardabweichung aller Untersucher kann man sagen, daß meine Werte für die Zahl der Bindungsstellen für Ouabain pro mononukleäre Zelle (34600 ± 9700 , $n = 133$) mit den Ergebnissen von Wiley et al. (132), Clausen et al. (30), Nielsen et al. (98), Pedersen und Klitgaard (105, 106), Oh et al. (102) und Boon et al. (19) übereinstimmen. Quastel und Kaplan (107) fanden an Lymphozyten in Kultur sehr viel mehr Bindungsstellen, was möglicherweise durch die über Nacht Kultivierung in autologem Plasma (s. 102) bedingt ist. Für die sehr viel höheren Werte von Arnott et al. (7) habe ich keine Erklärung.

Mononukleäre Leukozyten, stoffwechselaktive Zellen, haben eine sehr viel höhere Zahl an Bindungsstellen für Ouabain als Erythrozyten, die keinen Kern mehr besitzen und damit ein wesentliches Kriterium einer lebenden Zelle, nämlich die Teilungsfähigkeit entbehren (s. Tab. 13 und 14). Retikulozyten, junge Erythrozyten, in denen noch Zellorganellen, vor allem Ribosomen nachweisbar sind, verfügen über mehr Ouabainbindungsstellen (etwa 4000 pro Zelle, s. Tab. 13) (133). Im peripheren Blut verlieren die Retikulozyten innerhalb von 1 - 2 Tagen die Fähigkeit zur Proteinsynthese völlig und werden dadurch zu reifen Erythrozyten.

Die hohen Werte für die Standardabweichung der Zahl der Ouabainbindungsstellen mononukleärer Leukozyten bei allen Arbeitsgruppen weisen auf eine erhebliche interindividuelle Schwankungsbreite hin. Dies wird bei meinen Messungen deutlich, wenn man die einzelnen Werte verschiedener Normalpersonen (s. 3.3.3., Tab. 7) vergleicht. Bei mehrmaligen Messungen an mononukleären Leukozyten dieser Personen streuten die Ergebnisse jedoch auch sehr stark, was wiederum den hohen s-Werten zu entnehmen ist. Die großen intraindividuellen Schwankungen wurden besonders klar ersichtlich bei wiederholten Messungen an Zellen von Normalpersonen über einen Zeitraum von 18 Monaten (s. 3.3.2., Abb. 7). Diese Beobachtungen stehen im Widerspruch zu Schmalzing et al. (119) an Erythrozyten. Sie fanden zwar auch eine hohe interindividuelle

Schwankungsbreite der Rezeptorenzahl für Ouabain, jedoch bei wiederholten Messungen an 6 Personen keinerlei Änderung im Laufe eines Jahres.

Da eine homogene Erythrozytenpräparation relativ leicht zu bekommen ist, wohingegen, wie in Kapitel 4.1. ausführlich dargestellt, eine Leukozytenpräparation immer inhomogen und sehr variabel ist, sind möglicherweise die bei Leukozyten beobachteten intra- (und interindividuellen) Schwankungen gar nicht real, sondern nur Folge der Inkonstanz der Methode. Andererseits könnte es sein, daß wegen der geringen Genauigkeit der Methode Unterschiede zwischen zwei Populationen nicht erkannt werden.

Clausen et al. (30) untersuchten zum Beispiel die Frage, ob bei Patienten mit hyperkaliämischen Lähmungen die Krankheit durch einen Defekt der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase bedingt sein könnte. Wegen der leichten Verfügbarkeit führten sie ihre Messungen an Lymphozyten durch und kamen zu dem Ergebnis, daß sich die Rezeptorenzahl im anfallsfreien Intervall nicht von der von Normalpersonen unterscheidet (s. Tab. 14). Berücksichtigt man jedoch die vielen Parameter, die die Messungen beeinflussen können, so stellt sich die Frage, ob bei einer Fallzahl von 5 die Ergebnisse wirklich aussagekräftig sind.

Es wurden noch weitere Studien über den Einfluß von Krankheiten oder Pharmaka auf das Bindungsverhalten mononukleärer Leukozyten zu Ouabain durchgeführt. Pedersen und Klitgaard (106) zeigten, daß die Anwesenheit von Chinidin im Inkubationsmedium die Zahl der Bindungsstellen nicht veränderte, jedoch die Dissoziationskonstante heraufsetzte, bedingt durch eine Verlangsamung der Assoziation des Ouabain-Rezeptor-Komplexes. Nielsen et al. (98) berichteten, daß die Rezeptorenzahl für Ouabain, wie auch diejenige für $(+)^{125}\text{J}$ -Cyanopindolol (24), bei Personen mit "borderline hypertension" erhöht ist. Wiley et al. (132) fanden für Ouabain, wie Sheppard et al. (125) für β -adrenerge Rezeptoren (s. Tab. 10), eine signi-

fikante Abnahme der Rezeptorenzahl bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie ohne Änderung der Dissoziationskonstanten.

4.3.5. Vergleich der Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche Blutzellen und an Herzmuskelgewebe

^3H -Ouabain bindet an menschliche mononukleäre Leukozyten (K_D : $2,8 \pm 1,2 \times 10^{-9}$ M, $n = 133$, s. Tab. 14) mit derselben Affinität wie an Herzmuskelzellmembranen (K_D : $3,7 \pm 0,2 \times 10^{-9}$ M, $n = 18$, s. Tab. 12, (25)) und an Erythrozyten (K_D : $2,8 \pm 0,5 \times 10^{-9}$ M, $n = 31$, s. Tab. 13 (48)). Die Untersuchungen an allen drei Zelltypen ergaben stets nur eine Art von Bindungsstellen. Das Glykosidrezeptorprotein scheint also identisch. Die Verteilung der Ouabainbindungsstellen auf der Zelloberfläche ist dagegen sehr unterschiedlich. Bei mononukleären Leukozyten errechnet sich eine Rezeptordichte von etwa $200/\mu\text{m}^2$ (19), bei Herzmuskelzellmembranen von circa $1000/\mu\text{m}^2$ (44) und bei Erythrozyten von ungefähr $1/\mu\text{m}^2$ (48). Allerdings erscheint mir die Angabe der Rezeptordichte bei einem Gemisch mononukleärer Zellen aus folgenden Gründen nicht sehr sinnvoll: Monozyten sind im Durchschnitt größer als Lymphozyten. Die Größe der Lymphozyten ist äußerst uneinheitlich. Außerdem kann man nicht wie Boon et al. (19) davon ausgehen, daß jede Zelle einer Kugel entspricht, da wie in Kapitel 4.1. gezeigt, die Zelloberfläche der B-Lymphozyten nicht glatt ist, sondern vielerlei Ausstülpungen aufweist.

Die oben genannten Argumente relativieren natürlich in gleicher Weise die Angabe der Rezeptorenzahl pro Zelle. Die Inhomogenität der Zellpräparation ist wohl auch der Grund für die weite intra- und interindividuelle Schwankung der Zahl der Ouabainbindungsstellen (3.3.2., 3.3.3.). Man muß leider sagen, daß trotz des gleichen Bindungsverhaltens zu Ouabain von Herzmuskelgewebe und von mononukleären Leukozyten sich diese Blutzellen nicht für Bindungsstudien eignen.

4.4. Einfluß von Kalium und von Diuretika auf die Bindung von Herzglykosiden

Bei Kaliummangel wird eine verminderte Glykosidtoleranz beobachtet, wobei zwischen dem Ausmaß der Hypokaliämie und der klinischen Symptomatik keine enge Korrelation besteht. Ein akut auftretender Kaliummangelzustand, zum Beispiel durch eine diuretische Therapie, führt zu einer besonders hohen Glykosidempfindlichkeit, während bei einer sich langsam entwickelnden Hypokaliämie höhere Glykosidkonzentrationen toleriert werden. Diese Beobachtungen können auf einer kaliumbedingten Änderung entweder der Glykosidrezeptoraffinität oder der Rezeptorenzahl beruhen.

Kalium im Inkubationsmedium verdrängt an menschlichen Herzmuskelzellmembranen Ouabain konzentrationsabhängig aus seiner Bindung am Herzglykosidrezeptor. Es erniedrigt die Rezeptoraffinität, wobei es die Assoziationsgeschwindigkeit stark verlangsamt, ohne die Dissoziationsgeschwindigkeit zu verändern. Die maximale Bindungskapazität bleibt dabei konstant (52). An intakten menschlichen Erythrozyten wurden dieselben Effekte beschrieben (64, 76). Auch bei Lymphozyten in Kultur setzte Kalium die Bindungsgeschwindigkeit für Ouabain herab (107). Arnott et al. (7) und Wiley et al. (132), die ein kaliumhaltiges Inkubationsmedium verwendeten, fanden an intakten Lymphozyten eine höhere Dissoziationskonstante im Vergleich mit anderen Untersuchern, die ein kaliumfreies Medium benutzten (s. Tab. 14).

Aus den vorangestellten Untersuchungen geht hervor, daß Kalium in vitro die Bindung von Ouabain an die $(Na^+ + K^+)$ -ATPase erheblich beeinflusst. Darüber hinaus ist es nun interessant, den Effekt eines niedrigen Serumkaliums auf die $(Na^+ + K^+)$ -ATPase zu untersuchen. Chronische Hypokaliämie verändert nicht die intrazelluläre K^+ -Konzentration der Herzmuskelzelle, aber verringert den Kaliumgehalt der Skelettmuskelzelle (17, 69, 100). An Herzmuskelzellmembranen von Meerschweinchen (12, 46) und von Kaninchen (130), die für etwa 2 - 4 Wochen kaliumarm

ernährt wurden, zeigte sich ein Anstieg der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität. An kultivierten Herzmuskelzellen von Hühnerembryonen, die 3 Tage einem niedrigen Kaliummilieu ausgesetzt waren, fand sich ebenfalls eine Zunahme der Natriumpumpenmoleküle und somit der Herzglykosidrezeptoren (131). Dieser Anstieg der Rezeptorenzahl ist möglicherweise für die Konstanthaltung des intrazellulären Kaliums am Herzen bei Hypokaliämie verantwortlich. An der Skelettmuskelzelle wird dagegen bei Hypokaliämie keine erhöhte Rezeptorenzahl berichtet. Sie bleibt entweder unverändert bei Kaninchen (130) oder ist erniedrigt bei Ratten (29, 100). Die Abnahme der Bindungsstellen für Ouabain der Skelettmuskulatur führt zu einer gesteigerten Glykosidserumkonzentration. Diese Umverteilung der Herzglykoside kann eine mögliche Erklärung für die erhöhte Digitalistoxizität am Herzen bei Hypokaliämie sein (29, 100).

Die intrazelluläre Kaliumkonzentration von Erythrozyten von Ratten (100) und Menschen (49) ist bei chronischer Hypokaliämie nicht verändert. An Erythrozytenmembranen von Patienten mit akuter Hypokaliämie (2 Tage Dauer) fand sich keine Änderung der Zahl der Bindungsstellen für Ouabain gegenüber Kontrollpersonen, jedoch bei Patienten mit chronischer Hypokaliämie ein Anstieg der Rezeptorenzahl (49). Nach Kaliumsubstitution ging die Zahl der Ouabainbindungsstellen erst nach 75 - 130 Tagen auf Normalwerte zurück. Da dieser Zeitraum etwa der Lebenszeit von Erythrozyten entspricht, schlossen die Autoren daraus, daß es sich bei dem Rezeptoranstieg um einen adaptiven Mechanismus im Rahmen der Erythropoese handeln könnte. Rubythron und Morgan (114) zeigten ebenfalls einen Anstieg der Zahl der Natriumpumpen bei Patienten mit chronischer Hypokaliämie, jedoch auch bei Patienten, die eine Hypokaliämie für wahrscheinlich weniger als 2 Wochen hatten. Sie sind deshalb im Gegensatz zu Erdmann und Krawietz (49) der Meinung, daß es auf der Erythrozytenmembran latente Glykosidrezeptoren geben müsse. Schober et al. (120) fanden bei Patienten mit Morbus Crohn zwar ein normales Serum-Kalium, aber ein erniedrigtes Gesamtkörper-Kalium. Die Zahl der Bindungsstellen für Ouabain von Erythrozyten war signifikant erhöht. Sie glauben

daher, daß Änderungen des Gesamtkörper-Kaliums die Synthese der $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -Pumpenmoleküle regulieren.

Der Leukozyt ist eine typischere Zelle als der Erythrozyt, da ersterer einen Kern und Mitochondrien sowie einen komplexen Stoffwechsel besitzt (103). Der Leukozyt könnte demnach auf äußere Einflüsse, wie zum Beispiel eine Hypokaliämie, durch Neusynthese von Rezeptoren reagieren. Die intrazelluläre Kaliumkonzentration korreliert mit Änderungen des Gesamtkörperkaliums durch Diät oder Diuretika (104). Der Kaliumgehalt der Leukozyten ändert sich sehr rasch je nach extrazellulärer Kaliumkonzentration: Ein neues Gleichgewicht stellt sich bereits nach etwa 40 Minuten ein, da der Kaliumtransport durch die Zellmembran von Leukozyten mehr als 50mal schneller als bei Erythrozyten erfolgt (27, 103). In der für die Präparation der Leukozyten notwendigen Zeitspanne könnte sich also bereits ein neues Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärem Kalium einstellen.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich der an Erythrozyten gefundene Anstieg der Ouabainbindungsstellen bei chronischer Hypokaliämie an Leukozyten ebenfalls zeigt. Bei meinen Messungen an mononukleären Leukozyten von Patienten mit chronischer Hypokaliämie unterschied sich weder die Zahl der Bindungsstellen für Ouabain noch die Dissoziationskonstante (K_D) von den Ergebnissen des Normalkollektivs (s. 3.4.). Nun ist die Bedeutung dieses Ergebnisses sehr schwer einzuschätzen. Wegen der Inkonstanz der Lymphozytenpräparation (s. 3.1.) und der großen interindividuellen Schwankungsbreite der Werte für Normalpersonen (s. 3.3.) ist es gut möglich, daß kleine Änderungen der Rezeptorenzahl nicht erkannt werden können. Zum anderen war die Ursache der Hypokaliämie bei dem untersuchten Patientenkollektiv nicht einheitlich.

Diuretika werden häufig bei der Behandlung der Hypertonie und der Herzinsuffizienz eingesetzt. Die wohl wichtigste Nebenwirkung gewisser Diuretika ist, da viele dieser Patienten auch

gleichzeitig mit Digitalis behandelt werden, die Hypokaliämie. Die Digitalisierung führt allein schon zu einem Kaliumverlust des Organismus. Ericsson et al. (57) fanden an Normalpersonen und Patienten unter Einnahme von Digoxin eine Abnahme des Gesamtkörper- und Skelettmuskel-Kaliums ohne Änderung des Serum-Kaliums. An Erythrozyten führte die Behandlung mit Digoxin zu einem intrazellulären Anstieg der Natriumkonzentration im selben Größenbereich wie bei Hypokaliämie und einem Abfall der Kaliumkonzentration (8).

In dieser Arbeit wurde der Einfluß von Hydrochlorothiazid und von Piretanid auf den Kaliumhaushalt und auf die Bindung von ^3H -Ouabain an mononukleäre Leukozyten von Normalpersonen untersucht. Die Hauptwirkung von Benzothiadiazinen besteht in einer Erhöhung der renalen Ausscheidung von Natrium und Chlorid durch eine Hemmung der Na-Reabsorption im distalen Tubulus, was sekundär eine gesteigerte Kaliumausscheidung zur Folge hat. Piretanid greift hauptsächlich am aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife an. Es führt zu einer höheren Natriumausscheidung als die Benzothiadiazine und ebenfalls zu einem Kaliumverlust (129).

Das Serum-Kalium macht nur maximal 0,4 % des gesamten Kaliumbestandes des Organismus aus (117). Etwa 98 % des Gesamtkörper-Kaliums ist intrazellulär, vorwiegend an Proteine gebunden. Die Normalwerte für das Ganzkörperkalium betragen bei Männern etwa 50 bis 55 mmol/kg KG (2 - 2,2 g/kg KG) und bei Frauen 40 bis 50 mmol/kg KG (1,6 - 2 g/kg KG) (79).

Da also das Serum-Kalium das Gesamtkörper-Kalium nur sehr unzuverlässig widerspiegelt, wurde bei unserer Untersuchung neben dem Serum-Kalium auch das Gesamtkörper-Kalium gemessen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, das Gesamtkörperkalium zu bestimmen, die untereinander schwer vergleichbar sind und von vielerlei Parametern abhängen (103), zum Beispiel die ^{42}K -Isotopenverdünnungsmethode oder die Messung der Strahlung des natürlichen Radiosotops ^{40}K , die in dieser Arbeit verwendet wurde (s. 2.4.2.). Bei dieser Methode ist bei einmaliger

Messung eine 20 %ige Abweichung von der Norm nötig, um mit 95 % Sicherheit diese zu erkennen, wohingegen bei wiederholten Messungen einer Person bereits bei einer 5 %igen Änderung dieses Signifikanzniveau erreicht werden kann (79).

Morgan und Davidson (93) geben einen Literaturüberblick über das Ausmaß der Hypokaliämie bei Diuretikabehandlung und kommen zu folgendem Schluß: "Hypokalaemia would almost disappear as an important complication of diuretic treatment if it was defined as a value less than 3,0 mmol/l rather than as a value less than 3,5 mmol/l." Am Ende der ersten Woche nach Behandlungsbeginn ist der größte Abfall des Serumkaliums erreicht; es ändert sich danach kaum mehr. Die durchschnittliche Abnahme der Serumkaliumkonzentration beträgt bei Gabe von Furosemid, einem stark wirksamen Schleifendiuretikum mit ähnlichem Wirkungsmechanismus wie Piretanid, nur 0,3 mmol/l, bei Einnahme der meisten Benzothiadiazine, darunter Hydrochlorothiazid, etwa 0,6 mmol/l weitgehend unabhängig von der Dosierung und der Dauer der Behandlung. Deshalb konnte bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit mit 25 mg Hydrochlorothiazid eine relativ niedrige Dosis gewählt werden. Daß bei den Untersuchungen mit Piretanid eine Person wegen zu starker Nebenwirkungen nach etwa der Hälfte der Zeit auf die halbierte Dosis (3 mg Piretanid) übergehen mußte, dürfte ebenso die Kaliumkonzentration nicht beeinflusst haben. Morgan und Davidson (93) zeigen ferner, daß etwa die Hälfte der Patienten, die mit Benzothiadiazinen behandelt werden, ein Serumkalium zwischen 3,0 und 3,5 mmol/l haben, die meisten von ihnen jedoch ohne klinische Symptome. Erst Werte unter 3,0 mmol/l sind potentiell gefährlich für die Patienten, werden aber nur äußerst selten (in etwa 7 % der Fälle) erreicht. Bei der Behandlung mit Furosemid findet man sogar nur in 5 % Werte kleiner 3,5 mmol/l und in 0,2 % Werte kleiner 3,0 mmol/l (93).

Unter der Therapie mit Benzothiadiazinen wurde ein längere Zeit reduziertes Gesamtkörperkalium (41, 74), ein initialer Abfall des Gesamtkörperkaliums, das sich im Laufe von 12 Monaten wieder normalisierte (136), beziehungsweise keinerlei

signifikante Änderung (68) beobachtet. Wenn Thiazide das Ganzkörperkalium überhaupt auf lange Sicht reduzieren, ist der Abfall so gering, daß er bei der überwiegenden Mehrheit der Patienten nicht zu Symptomen führt und somit klinisch nicht besonders relevant ist. Es scheint, daß ein Organismus eine langfristige Gesamtkörperkaliumerniedrigung um 10 - 15 % ohne Schaden tolerieren kann (41).

Bei meinen Untersuchungen mit Hydrochlorothiazid und Piretanid übten die Diuretika, wenn überhaupt, einen geringen, inkonstanten Effekt auf das Serum-Kalium und das Ganzkörper-Kalium aus (s. 3.5.). Die gemessenen Änderungen lassen sich nicht von physiologischen Schwankungen unterscheiden. Es bestand auch keine Korrelation zwischen den Werten für das Serum-Kalium und für das Gesamtkörper-Kalium. Einige Male wurde ein Serumkaliumwert kleiner 3,5 mmol/l gemessen, jedoch sank er bei keiner der Versuchspersonen unter 3,0 mmol/l ab. Bei der Einnahme von Hydrochlorothiazid (25 mg/d) traten keinerlei Erscheinungen auf, die auf eine klinisch relevante Hypokaliämie schließen lassen könnten. Bei den Personen, die Piretanid (6 mg/d) einnahmen, wurde eine stärkere diuretische Wirkung sowie vermehrt Muskelschwäche und Muskelkrämpfe beobachtet, die nach Absetzen des Medikaments im Laufe einer Woche verschwanden. Das Auftreten von Nebenwirkungen war mit den gemessenen Serumkaliumspiegeln nicht korreliert.

Bei den Messungen an mononukleären Leukozyten ließ sich keine systematische Änderung der Zahl der Bindungsstellen für Ouabain oder der Dissoziationskonstante des Glykosidrezeptorkomplexes erkennen. Die unsystematischen Schwankungen sind zu groß, um einen eventuellen kleinen spezifischen Effekt zu sehen. Erdmann et al. (56) zeigten an den Erythrozyten derselben Personen dieser Studie, daß die Einnahme von Hydrochlorothiazid bei gleichbleibender Serumkaliumkonzentration die Zahl und Affinität der Bindungsstellen für Ouabain nicht ändert. Insgesamt waren die Messungen an Erythrozyten konstanter. Dies läßt den Schluß zu, daß Diuretikagabe allein die Zahl der Ouabainrezeptoren von Erythrozyten nicht beeinflusst, sondern erst eine Diuretika-induzierte Hypokaliämie zu einem Rezeptoranstieg führt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob menschliche mononukleäre Leukozyten ^3H -Ouabain mit derselben Affinität und Kinetik binden wie Herzmuskelzellmembranen und gegebenenfalls als Modell für die Glykosidbindung am Herzmuskel dienen können. Außerdem sollte untersucht werden, ob Hypokaliämie die Affinität mononukleärer Leukozyten zu Ouabain oder die Zahl der Bindungsstellen pro Zelle ändert.

Zunächst wurden mehrere Methoden der Präparation mononukleärer Leukozyten hinsichtlich ihrer Reinheit und ihrer Zellausbeute ausprobiert. Für alle weiteren Untersuchungen wurde dann heparinisiertes Blut mit einer Dichtegradientenmethode nach Bøyum (14) präpariert. Dies führte zu einem Gemisch von Leukozyten (Lymphozyten: $76 \pm 12\%$, Monozyten: $22 \pm 12\%$, Neutrophile Granulozyten: $0 - 3\%$, Basophile Granulozyten: $0 - 3\%$, Eosinophile Granulozyten: $0 - 2\%$, $n = 133$) mit einer Zellvitalität von etwa 63% . Die Zellausbeute betrug bei Lymphozyten $46 \pm 16\%$, bei Monozyten $87 \pm 36\%$ und bei Neutrophilen Granulozyten $0,16 \pm 0,14\%$ ($n = 15$). Außer Leukozyten befanden sich in der Probe auch Erythrozyten etwa im Verhältnis $2 : 1$, sowie Thrombozyten im Verhältnis $1 : 1$.

Die Bindung von ^3H -Ouabain an menschliche mononukleäre Leukozyten folgte einer Sättigungskinetik. Ein Äquilibrium stellte sich nach etwa drei Stunden ein. Der Ouabain-Rezeptor-Komplex blieb für mindestens sechs Stunden stabil. Die unspezifische Bindung, also das nicht rezeptorgebundene ^3H -Ouabain, machte stets weniger als 10% der Gesamtbindung aus. Die Assoziation folgte eine Kinetik 2. Ordnung (k_{+1} : $3,85 \times 10^4 \text{ Mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$, $n = 2$), die Dissoziation war eine Reaktion 1. Ordnung (k_{-1} : $8,05 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$, $n = 2$). Es fand sich nur eine Art von Bindungsstellen.

Konzentrationsabhängige Bindungsstudien mit ^3H -Ouabain an mononukleären Leukozyten von 34 Normalpersonen ergaben eine Rezeptorenzahl von 34600 ± 9700 pro Zelle ($n = 133$), wobei sich

große intra- und interindividuelle Schwankungen zeigten. Die Zahl der Ouabainbindungsstellen und die Dissoziationskonstante des Ouabain-Rezeptor-Komplexes (K_D : $2,8 \pm 1,2 \times 10^{-9}$ M, $n = 133$) waren unabhängig vom prozentualen Anteil an Monozyten in der Probe sowie vom Serumkaliumspiegel. Diesen Ergebnissen zufolge müßten Lymphozyten und Monozyten etwa dieselbe Rezeptorenzahl besitzen. Die Dissoziationskonstanten entsprachen etwa den an menschlichen Herzmuskelzellmembranen gefundenen Werten (K_D : $3,7 \pm 0,2 \times 10^{-9}$ M, $n = 18$, s. Tab. 12, (25)). Das Glykosidrezeptorprotein scheint also identisch.

Die Ouabainbindung an mononukleäre Leukozyten von acht Patienten mit chronischer Hypokaliämie wurde gemessen. Die Ergebnisse (BS: 34900 ± 10500 , K_D : $3,2 \pm 0,9 \times 10^{-9}$ M, $n = 11$) unterschieden sich nicht signifikant von denen bei Normalpersonen. Es wurde ferner versucht, durch Gabe von Hydrochlorothiazid beziehungsweise Piretanid den Serumkaliumspiegel und das Gesamtkörperkalium von Normalpersonen zu senken. Die Diuretika übten jedoch, wenn überhaupt, nur einen geringen, inkonstanten Effekt auf das Serumkalium und das Ganzkörperkalium aus. Die Zahl der Bindungsstellen für Ouabain mononukleärer Leukozyten dieser Versuchspersonen sowie die Dissoziationskonstante des Glykosidrezeptorkomplexes ließen keine systematische Änderung erkennen.

Die verschiedenen Lymphozytenuntergruppen und die Monozyten unterscheiden sich bezüglich ihrer Morphologie, Größe, Oberflächenbeschaffenheit, Lebensdauer und Funktion sehr stark voneinander. Dies ist sicherlich der Grund dafür, daß Bindungsstudien an mononukleären Leukozyten nicht nur mit Herzglykosiden, sondern auch mit anderen Pharmaka, wie zum Beispiel β -adrenergen Substanzen, häufig zu recht gegensätzlichen Ergebnissen führen. Trotz der gleichen Affinität zu Ouabain von menschlichen mononukleären Leukozyten und Herzmuskelzellen eignen sich diese Blutzellen nicht für Bindungsversuche, etwa für diagnostische Zwecke in der Klinik, da die Ergebnisse auf Grund der Inhomogenität der Zellpräparation zu große Schwankungen aufweisen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. AARONS, R. D., MOLINOFF, P. B.:
Changes in the density of beta adrenergic receptors in rat lymphocytes, heart and lung after chronic treatment with propranolol.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 221, 439 - 443 (1982)
2. AARONS, R. D., NIES, A. S., GAL, J., HEGSTRAND, R., MOLINOFF, P. B.:
Elevation of β -adrenergic receptor density in human lymphocytes after propranolol administration.
J. Clin. Invest. 65, 949 - 957 (1980)
3. ABRASS, I. B., SCARPACE, P. J.:
Human lymphocyte beta-adrenergic receptors are unaltered with age.
J. Gerontol. 36, 298 - 301 (1981)
4. AKERA, T., BRODY, T. M.:
The role of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in the inotropic action of digitalis.
Pharmacol. Rev. 29, 187 - 220 (1977)
5. ALLGAYER, H., BROWN, L., KRUIS, W., ERDMANN, E., PAUMGARTNER, G.:
Inhibition of human colonic $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase by arachidonic and linoleic acids.
Zur Veröffentlichung eingereicht.
6. ARCHER, J. A., GORDEN, P., ROTH, J.:
Defect in insulin binding to receptors in obese man. Amelioration with caloric restriction.
J. Clin. Invest. 55, 166 - 174 (1975)
7. ARNOTT, R. D., WHITE, R., JERUMS, G.:
Effect of thyroid status on ouabain binding to the human lymphocyte.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 54, 1150 - 1156 (1982)
8. ASTRUP, J.:
The effect of hypokalaemia and of digoxin therapy on red cell sodium and potassium content. Some clinical aspects.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33, 11 - 16 (1974)
9. BEGEMANN, H. (Hg.):
Klinische Hämatologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2. A. (1975)
10. BIDART, J. M., MOINGEON, P., BOHOUN, C.:
Muscarinic cholinergic receptors on circulating human lymphocytes: Evidence for a particulate binding site.
Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol. 39, 169 - 172 (1983)
11. BISHOPRIC, N. H., COHEN, H. J., LEFKOWITZ, R. J.:
Beta adrenergic receptors in lymphocyte subpopulations.
J. Allergy Clin. Immunol. 65, 29 - 33 (1980)

12. BLUSCHKE, V., BONN, R., GREEFF, K.:
Increase in the $(Na^+ + K^+)$ -ATPase activity in heart muscle after chronic treatment with digitoxin or potassium deficient diet.
Eur. J. Pharmacol. 37, 189 - 191 (1976)
13. BØYUM, A.:
Separation of white blood cells.
Nature 204, 793 - 794 (1964)
14. BØYUM, A.:
Separation of leucocytes from blood and bone marrow.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 97 (1968)
15. BØYUM, A.:
Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes.
Tissue Antigens 4, 269 - 274 (1974)
16. BØYUM, A.:
Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages.
Scand. J. Immunol. 5, Suppl. 5, 9 - 15 (1976)
17. BOLTE, H.-D., LÜDERITZ, B., ERDMANN, E., STEINBECK, G.:
Zellwasser, Zellkalium- und -Natrium von Herz und Skelettmuskulatur im chronischen Kaliummangel.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 78, 1052 - 1056 (1972)
18. BONDY, B., GLUBA, H., REMIEN, J.:
Dopamin-Rezeptoren an B-Lymphozyten des Menschen.
Arzneim.-Forsch. 32, 876 - 877 (1982)
19. BOON, N. A., OH, V. M. S., TAYLOR, E. A., JOHANSEN, T., ARONSON, J. K., GRAHAME-SMITH, D. G.:
Measurement of specific 3H -ouabain binding to different types of human leucocytes.
Br. J. Clin. Pharmacol. 18, 153 - 161 (1984)
20. BOURNE, H. R., MELMON, K. L.:
Adenyl cyclase in human leucocytes: Evidence for activation by separate beta adrenergic and prostaglandin receptors.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 178, 1 - 7 (1971)
21. BREE, F., GAULT, I., D'ATHIS, P., TILLEMENT, J.-P.:
Beta adrenoceptors of human red blood cells, determination of their subtypes.
Biochem. Pharmacol. 33, 4045 - 4050 (1984)
22. BRODDE, O.-E., DAUL, A., O'HARA, N.:
 β -Adrenoceptor changes in human lymphocytes, induced by dynamic exercise.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 325, 190 - 192 (1984)
Erratum: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 328, 362 (1985)

23. BRODDE, O.-E., ENGEL, G., HOYER, D., BOCK, K. D.,
WEBER, F.:
The β -adrenergic receptor in human lymphocytes:
Subclassification by the use of a new radio-ligand,
(+)-¹²⁵I-iodocyanopindolol.
Life Sci. 29, 2189 - 2198 (1981)
24. BRODDE, O.-E., PRYWARRA, A., DAUL, A., ANLAUF, M.,
BOCK, K. D.:
Correlation between lymphocyte β_2 -adrenoceptor density
and mean arterial blood pressure: Elevated β -adreno-
ceptors in essential hypertension.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 6, 678 - 682 (1984)
25. BROWN, L., ERDMANN, E.:
Binding of digitalis derivatives to beef, cat and human
cardiac ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase. Affinity and kinetic constants.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 271, 229 - 240 (1984)
26. BROWN, L., ERDMANN, E., THOMAS, R.:
Digitalis structure-activity relationship analyses.
Conclusions from indirect binding studies with cardiac
($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase.
Biochem. Pharmacol. 32, 2767 - 2774 (1983)
27. CIVIDALLI, G., NATHAN, D. G.:
Sodium and potassium concentration and transmembrane
fluxes in leukocytes.
Blood 43, 861 - 869 (1974)
28. CLARK, A. J.:
The mode of action of drugs on cells.
Williams and Wilkins, Baltimore (1933)
29. CLAUSEN, T., HANSEN, O., KJELDSSEN, K., NØRGAARD, A.:
Effect of age, potassium depletion and denervation on
specific displaceable ³H-ouabain binding in rat skeletal
muscle in vivo.
J. Physiol. 333, 367 - 381 (1982)
30. CLAUSEN, T., WANG, P., ØRSKOV, H., KRISTENSEN, O.:
Hyperkalemic periodic paralysis. Relationships between
changes in plasma water, electrolytes, insulin and
catecholamines during attacks.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 40, 211 - 220 (1980)
31. COLUCCI, W. S., ALEXANDER, R. W., WILLIAMS, G. H., RUDE,
R. E., HOLMAN, B. L., KONSTAM, M. A., WYNNE, J., MUDGE,
G. H., BRAUNWALD, E.:
Decreased lymphocyte beta-adrenergic-receptor density in
patients with heart failure and tolerance to the beta-
adrenergic agonist pirbuterol.
N. Engl. J. Med. 305, 185 - 190 (1981)
32. CREESE, I., SIBLEY, D. R.:
Comments on the commentary by Dr. Seeman.
Biochem. Pharmacol. 31, 2568 - 2569 (1982)

33. CRESSIE, N. A. C., KEIGHTLEY, D. D.:
The underlying structure of the direct linear plot with application to the analysis of hormone-receptor interactions.
J. Steroid Biochem. 11, 1173 - 1180 (1979)
34. DAIGUJI, M., MELTZER, H. Y., U'PRICHARD, D.:
Human platelet α_2 -adrenergic receptors: Labeling with ^3H -yohimbine, a selective antagonist ligand.
Life Sci. 28, 2705 - 2717 (1981)
35. DANEK, A., O'DORISIO, M. S., O'DORISIO, T. M.,
GEORGE, J. M.:
Specific binding sites for vasoactive intestinal polypeptide on nonadherent peripheral blood lymphocytes.
J. Immunol. 131, 1173 - 1177 (1983)
36. DAVIES, A. O., LEFKOWITZ, R. J.:
Corticosteroid-induced differential regulation of β -adrenergic receptors in circulating human polymorphonuclear leukocytes and mononuclear leukocytes.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 51, 599 - 605 (1980)
37. DE LUISE, M., BLACKBURN, G. L., FLIER, J. S.:
Reduced activity of the red-cell sodium-potassium pump in human obesity.
N. Engl. J. Med. 303, 1017 - 1022 (1980)
38. DESNUELLE, C., LOMBET, A., SERRATRICE, G., LAZDUNSKI, M.:
Sodium channel and sodium pump in normal and pathological muscles from patients with myotonic muscular dystrophy and lower motor neuron impairment.
J. Clin. Invest. 69, 358 - 367 (1982)
39. DOYLE, V., O'MALLEY, K., KELLY, J. G.:
Human lymphocyte β -adrenoceptor density in relation to age and hypertension.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 4, 738 - 740 (1982)
40. DUNHAM, P. B., GUNN, R. B.:
Adenosine triphosphatase and active cation transport in red blood cell membranes.
Arch. Int. Med. 129, 241 - 247 (1972)
41. EDMONDS, C. J., JASANI, B.:
Total-body potassium in hypertensive patients during prolonged diuretic therapy.
Lancet II, 8 - 12 (1972)
42. ELLORY, J. C., KEYNES, R. D.:
Binding of tritiated digoxin to human red cell ghosts.
Nature 221, 776 (1969)
43. ERDMANN, E.:
Pharmakon-Rezeptor-Interaktionen am Beispiel des Herzglykosidrezeptors der Erythrozytenmembran.
Blut 32, 61 - 70 (1976)

44. ERDMANN, E.:
Cell membrane receptors for cardiac glycosides in the heart.
Basic Res. Cardiol. 72, 315 - 325 (1977)
45. ERDMANN, E.:
Influence of cardiac glycosides on their receptor.
In: Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 56/I, ed. K. Greeff, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 337 - 380 (1981)
46. ERDMANN, E., BOLTE, H.-D., LÜDERITZ, B.:
The $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase activity of guinea pig heart muscle in potassium deficiency.
Arch. Biochem. Biophys. 145, 121 - 125 (1971)
47. ERDMANN, E., BROWN, L.:
The cardiac glycoside-receptor system in the human heart.
Eur. Heart J. 4 (Suppl. A), 61 - 65 (1983)
48. ERDMANN, E., HASSE, W.:
Quantitative aspects of ouabain binding to human erythrocyte and cardiac membranes.
J. Physiol. 251, 671 - 682 (1975)
49. ERDMANN, E., KRAWIETZ, W.:
Increased number of ouabain binding sites on human erythrocyte membranes in chronic hypokalaemia.
Acta Biol. Med. Germ. 36, 879 - 883 (1977)
50. ERDMANN, E., KRAWIETZ, W., KOCH, M.:
Cardiac glycoside receptors in disease. The number of ouabain binding sites in human erythrocytes is subject to regulation.
In: $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase, structure and kinetics.
Ed. J. C. Skou, J. G. Nørby, Academic Press, London, 517 - 524 (1979)
51. ERDMANN, E., PHILIPP, G., SCHOLZ, H.:
Cardiac glycoside receptor, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase activity and force of contraction in rat heart.
Biochem. Pharmacol. 29, 3219 - 3229 (1980)
52. ERDMANN, E., PRESEK, P., SWOZIL, R.:
Über den Einfluß von Kalium auf die Bindung von Strophanthin an menschliche Herzmuskelzellmembranen.
Klin. Wschr. 54, 383 - 387 (1976)
53. ERDMANN, E., SCHONER, W.:
Ouabain-receptor interactions in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase preparations from different tissues and species. Determination of kinetic constants and dissociation constants.
Biochim. Biophys. Acta 307, 386 - 398 (1973)

54. ERDMANN, E., WERDAN, K., BROWN, L.:
Neue Befunde zum Wirkungsmechanismus der Herzglykoside.
In: Herzinsuffizienz - Pathophysiologie, Klinik und Therapie. J. Keul, H.-H. Dickhuth, (Hg.), Perimed-Verlag, Erlangen, 248 - 254 (1984)
55. ERDMANN, E., WERDAN, K., HEGELBERGER, R., PRUCHNIEWSKI, M., CHRISTL, S.:
Determination of the number of $(Na^+ + K^+)$ -ATPase molecules, their enzymatic activity and the active Na^+/K^+ -transport of human erythrocytes in hypokalaemia and in hypertension.
In: Intracellular electrolytes and arterial hypertension. Ed. H. Zunkley, H. Losse, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 164 - 170 (1980)
56. ERDMANN, E., WERDAN, K., KRAWIETZ, W.:
Influence of digitalis and diuretics on ouabain binding sites of human erythrocytes.
Klin. Wschr. 62, 87 - 92 (1984)
57. ERICSSON, F., CARLMARK, B., JOGESTRAND, T., SUNDQUIST, K.:
Effect of digoxin upon intracellular potassium in man.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 41, 457 - 463 (1981)
58. FORD, A. R., ARONSON, J. K., GRAHAME-SMITH, D. G., CARVER, J. G.:
Changes in cardiac glycoside receptor sites, $^{86}Rb^+$ -uptake and intracellular sodium concentrations in the erythrocytes of patients receiving digoxin during the early phases of treatment of cardiac failure in regular rhythm and of atrial fibrillation.
Br. J. Clin. Pharmacol. 8, 125 - 134 (1979)
59. FORD, A. R., ARONSON, J. K., GRAHAME-SMITH, D. G., CARVER, J. G.:
The acute changes seen in cardiac glycoside receptor sites, ^{86}Rb uptake and intracellular sodium concentrations in the erythrocytes of patients during the early phases of digoxin therapy are not found during chronic therapy: Pharmacological and therapeutic implications for chronic digoxin therapy.
Br. J. Clin. Pharmacol. 8, 135 - 142 (1979)
60. FRASER, J., NADEAU, J., ROBERTSON, D., WOOD, A. J. J.:
Regulation of human leukocyte beta receptors by endogenous catecholamines. Relationship of leukocyte beta receptor density to the cardiac sensitivity to isoproterenol.
J. Clin. Invest. 67, 1777 - 1784 (1981)
61. FRIEMEL, H. (Hg.):
Immunologische Arbeitsmethoden.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 2. A. (1980)

62. van FURTH, R., COHN, Z. A., HIRSCH, J. G., HUMPHREY, J. H., SPECTOR, W. G., LANGEVOORT, H. L.:
The mononuclear system: A new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells.
Bull. W. H. O. 46, 845 - 852 (1972)
63. GALANT, S. P., UNDERWOOD, S., DURISETI, L., INSEL, P. A.:
Characterization of the high-affinity β_2 -adrenergic receptor binding of (-)- ^3H -dihydroalprenolol to human polymorphonuclear cell particulates.
J. Lab. Clin. Med. 92, 613 - 618 (1978)
64. GARDNER, J. D., CONLON, T. P.:
The effects of sodium and potassium on ouabain binding by human erythrocytes.
J. Gen. Physiol. 60, 609 - 629 (1972)
65. GARDNER, J. D., KIINO, D. R.:
Ouabain binding and cation transport in human erythrocytes.
J. Clin. Invest. 52, 1845 - 1851 (1973)
66. GINSBERG, A. M., CLUTTER, W. E., SHAH, S. D., CRYER, P. E.:
Triiodothyronine-induced thyrotoxicosis increases mononuclear leukocyte β -adrenergic receptor density in man.
J. Clin. Invest. 67, 1785 - 1791 (1981)
67. GMELIG, F. H. J.:
Characterization of human lymphocyte subpopulations by cell surface markers.
Medical Faculty of the University of Utrecht, Dissertation 285 pp. (1977)
68. GRAYBIEL, A. L., SODE, J.:
Diuretics, potassium depletion and carbohydrate intolerance.
Lancet, II, 265 (1971)
69. HALL, R. J. C., CAMERON, I. R.:
Effect of chronic dietary potassium depletion and repletion on cardiac and skeletal muscle structure, electrolytes and pH in the rabbit.
Clin. Sci. 60, 441 - 449 (1981)
70. HALPER, J. P., MANN, J. J., WEKSLER, M. E., BILEZIKIAN, J. P., SWEENEY, J. A., BROWN, R. P., GOLBOURNE, T.:
Beta adrenergic receptors and cyclic AMP levels in intact human lymphocytes: Effects of age and gender.
Life Sci. 35, 855 - 863 (1984)
71. HANSEN, O.:
The relationship between g-strophanthin-binding capacity and ATPase activity in plasma-membrane fragments from ox brain.
Biochim. Biophys. Acta 233, 122 - 132 (1971)

72. HJØLLUND, E., RICHELSEN, B., BECK-NIELSEN, H., PEDERSEN, O.:
The effect of glibenclamide on insulin receptors in normal man: Comparative studies of insulin binding to monocytes and erythrocytes.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 57, 1257 - 1263 (1983)
73. HOFFMANN, B. B., DE LEAN, A., WOOD, C. L., SCHOCKEN, D. D., LEFKOWITZ, R. J.:
Alpha-adrenergic receptor subtypes: Quantitative assessment by ligand binding.
Life Sci. 24, 1739 - 1746 (1979)
74. IBSEN, H.:
Red blood cell potassium as a measure of body potassium in thiazide-treated patients with essential hypertension.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 34, 161 - 165 (1974)
75. JAKOBS, K. H., SAUR, W., SCHULTZ, G.:
Characterization of α - and β -adrenergic receptors linked to human platelet adenylate cyclase.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 302, 285 - 291 (1978)
76. JOINER, C. H., LAUF, P. K.:
The correlation between ouabain binding and potassium pump inhibition in human and sheep erythrocytes.
J. Physiol. 283, 155 - 175 (1978)
77. JULIUS, M. H., SIMPSON, E., HERZENBERG, L. A.:
A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 3, 645 - 649 (1973)
78. KAJI, D. M., THAKKAR, U., KAHN, T.:
Glucocorticoid-induced alterations in the sodium-potassium pump of the human erythrocyte.
J. Clin. Invest. 68, 422 - 430 (1981)
79. KASSIRER, J. P., HARRINGTON, J. T.:
Diuretics and potassium metabolism: A reassessment of the need, effectiveness and safety of potassium therapy.
Kidney Int. 11, 505 - 515 (1977)
80. KEIGHTLEY, D. D., CRESSIE, N. A. C.:
The Woolf plot is more reliable than the Scatchard plot in analysing data from hormone receptor assays.
J. Steroid Biochem. 13, 1317 - 1323 (1980)
81. KLEIHauer, E. (Hg.):
Hämatologie.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1978)
82. KRALL, J. F., CONNELLY, M., TUCK, M. T.:
Acute regulation of beta adrenergic catecholamine sensitivity in human lymphocytes.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 214, 554 - 560 (1980)

83. LADURON, P. M.:
Criteria for receptor sites in binding studies.
Biochem. Pharmacol. 33, 833 - 839 (1984)
84. LAMVIK, J. O.:
Separation of lymphocytes from human blood.
Acta Haematol. 35, 294 - 303 (1966)
85. LANDMANN, R., BITTIGER, H., BÜHLER, F. R.:
High affinity beta-2-adrenergic receptors in mononuclear
leucocytes: Similar density in young and old normal
subjects.
Life Sci. 29, 1761 - 1771 (1981)
86. LANDMANN, R., BÜRGISSER, E., BÜHLER, F. R.:
Human lymphocytes as a model for beta-adrenergic recep-
tors in clinical investigations.
J. Receptor Res. 3, 71 - 88 (1983)
87. LESNIAK, M. A., GORDEN, P., ROTH, J., GAVIN, J. R.:
Binding of 125 I-human growth hormone to specific recep-
tors in human cultured lymphocytes. Characterization of
the interaction and a sensitive radioreceptor assay.
J. Biol. Chem. 249, 1661 - 1667 (1974)
88. LÖFFLER, H.:
Cytochemischer Nachweis von unspezifischer Esterase in
Ausstrichen; Beiträge zur Technik und Ergebnisse im
Blutausstrich des Menschen.
Klin. Wschr. 39, 1220 - 1227 (1961)
89. LÖFFLER, G., PETRIDES, P. E., WEISS, L., HARPER, H. A.:
Physiologische Chemie.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2. A.
(1979)
90. MALOTEAUX, J.-M., GOSSUIN, A., WATERKEYN, C., LADURON,
P.-M.:
Trapping of labelled ligands in intact cells: A pitfall
in binding studies.
Biochem. Pharmacol. 32, 2543 - 2548 (1983)
91. MELIEF, C. J. M., SCHWEITZER, M., ZEYLEMAKER, W. P.,
VERHAGEN, E. H., EIJSVOOGEL, V. P.:
Some immunological properties of lymphoid cells from
patients with acute lymphatic leukaemia (ALL).
Clin. Exp. Immunol. 15, 131 - 143 (1973)
92. MOINGEON, P., BIDART, J. M., ALBERICI, G. F., BOHUON, C.:
Characterization of a peripheral-type benzodiazepine
binding site on human circulating lymphocytes.
Eur. J. Pharmacol. 92, 147 - 149 (1983)
93. MORGAN, D. B., DAVIDSON, C.:
Hypokalaemia and diuretics: An analysis of publications.
Br. Med. J. 280, 905 - 908 (1980)

94. MOTOJIMA, S., FUKUDA, T., MAKINO, S.:
Measurement of β -adrenergic receptors on lymphocytes in normal subjects and asthmatics in relation to β -adrenergic hyperglycaemic response and bronchial responsiveness.
Allergy 38, 331 - 337 (1983)
95. MOTULSKY, H. J., INSEL, P. A.:
Adrenergic receptors in man. Direct identification, physiologic regulation and clinical alterations.
N. Engl. J. Med. 307, 18 - 29 (1982)
96. MOTULSKY, H. J., INSEL, P. A.:
 ^3H -Dihydroergocryptine binding to α -adrenergic receptors of human platelets. A reassessment using the selective radioligands ^3H -prazosin, ^3H -yohimbine and ^3H -rauwolscine.
Biochem. Pharmacol. 31, 2591 - 2597 (1982)
97. MOTULSKY, H. J., SHATTIL, S. J., INSEL, P. A.:
Characterization of α_2 -adrenergic receptors on human platelets using ^3H -yohimbine.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 1562 - 1570 (1980)
98. NIELSEN, J. R., PEDERSEN, K. E., JOHANSEN, T., KLITGAARD, N. A.:
Ouabain-binding and ^{86}Rb -uptake in lymphocytes of normal and borderline hypertensive subjects.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 43, 393 - 399 (1983)
99. NOBLE, D.:
Mechanism of action of therapeutic levels of cardiac glycosides.
Cardiovasc. Res. 14, 495 - 514 (1980)
100. NØRGAARD, A., KJELDSEN, K., CLAUSEN, T.:
Potassium depletion decreases the number of ^3H -ouabain binding sites and the active Na-K transport in skeletal muscle.
Nature 293, 739 - 741 (1981)
101. NØRGAARD, A., KJELDSEN, K., CLAUSEN, T.:
A method for the determination of the total number of ^3H -ouabain binding sites in biopsies of human skeletal muscle.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 44, 509 - 518 (1984)
102. OH, V. M. S., TAYLOR, E. A., BOON, N. A., ARONSON, J. K., GRAHAME-SMITH, D. G.:
Stimulation of tritiated-ouabain binding to intact human lymphocytes by normal human and fetal calf serum.
Br. J. Clin. Pharmacol. 15, 618P (1983)
103. PATRICK, J.:
Assessment of body potassium stores.
Kidney Int. 11, 476 - 490 (1977)

104. PATRICK, J., BRADFORD, B. N.:
A comparison of leucocyte potassium content with other measurements in potassium depleted rabbits.
Clin. Sci. 42, 415 - 421 (1972)
105. PEDERSEN, K. E., KLITGAARD, N. A.:
The characteristics of ^3H -ouabain binding to human lymphocytes.
Br. J. Clin. Pharmacol. 15, 657 - 665 (1983)
106. PEDERSEN, K. E., KLITGAARD, N. A.:
Influence of quinidine on the binding of ^3H -ouabain and ^3H -digoxin by human lymphocytes.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 25, 263 - 270 (1983)
107. QUASTEL, M. R., KAPLAN, J. G.:
Ouabain binding to intact lymphocytes. Enhancement by phytohemagglutinin and leucoagglutinin.
Exp. Cell Res. 94, 351 - 362 (1975)
108. REINECKE, G., PABST, R.:
Subsets of blood, spleen and recirculating lymphocytes in man.
Clin. Exp. Immunol. 53, 672 - 678 (1983)
109. REPKE, K., EST, M., PORTIUS, H. J.:
Über die Ursache der Speciesunterschiede in der Digitalisempfindlichkeit.
Biochem. Pharmacol. 14, 1785 - 1802 (1965)
110. REPKE, K., PORTIUS, H. J.:
Über die Identität der Ionenpumpen-ATPase in der Zellmembran des Herzmuskels mit einem Digitalis-Rezeptorenzym.
Experientia 19, 452 - 458 (1963)
111. RICK, W.:
Klinische Chemie und Mikroskopie.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 5. A. (1977)
112. RITCHIE, A. W. S., OSWALD, I., MICKLEM, H. S.,
BOYD, J. E., ELTON, R. A., JAZWINSKA, E., JAMES, K.:
Circadian variation of lymphocyte subpopulations:
A study with monoclonal antibodies.
Br. Med. J. 286, 1773 - 1775 (1983)
113. ROTHBARTH, H., HENDRIKS-STURKENBOOM, I., PLOEM, J. S.:
Identification of monocytes in suspensions of mononuclear cells.
Blood 48, 139 - 147 (1976)
114. RUBYTHON, E. I., MORGAN, D. B.:
Effect of hypokalaemia on the ouabain-sensitive sodium transport and the ouabain-binding capacity in human erythrocytes.
Clin. Sci. 64, 177 - 182 (1983)

115. SAGER, G.:
β-2 Adrenergic receptors on intact human erythrocytes.
Biochem. Pharmacol. 32, 1946 - 1949 (1983)
116. SCATCHARD, G.:
The attractions of proteins for small molecules.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660 - 672 (1949)
117. SCHÄFER, G. E., WERNER, E.:
Kalium-Mangel durch Diuretika-Medikation.
Schwerpunkt Medizin 3, 53 - 58 (1980)
118. SCHATZMANN, H.-J.:
Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrozytenmembran.
Helv. Physiol. Acta 11, 346 - 354 (1953)
119. SCHMALZING, G., PFAFF, E., BREYER-PFAFF, U.:
Red cell ouabain binding sites, Na⁺K⁺-ATPase and intracellular Na⁺ as individual characteristics.
Life Sci. 29, 371 - 381 (1981)
120. SCHOBER, O., BOSSALLER, C., LEHR, L., HUNDESHAGEN, H.:
Altered potassium homeostasis in Crohn's disease.
Eur. J. Nucl. Med. 8, 245 - 249 (1983)
121. SCHOCKEN, D. D., ROTH, G. S.:
Reduced β-adrenergic receptor concentrations in ageing man.
Nature 267, 856 - 858 (1977)
122. SCHWARTZ, A., LINDENMAYER, G. E., ALLEN, J. C.:
The sodium-potassium adenosine triphosphatase: Pharmacological, physiological and biochemical aspects.
Pharmacol. Rev. 27, 3 - 133 (1975)
123. SCHWARTZ, R. H., BIANCO, A. R., HANDWERGER, B. S., KAHN, C. R.:
Demonstration that monocytes rather than lymphocytes are the insulin-binding cells in preparations of human peripheral blood mononuclear leukocytes: Implications for studies of insulin-resistant states in man.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 474 - 478 (1975)
124. SEEMAN, P.:
Nomenclature of central and peripheral dopaminergic sites and receptors.
Biochem. Pharmacol. 31, 2563 - 2568 (1982)
125. SHEPPARD, J. R., GORMUS, R., MOLDOW, C. F.:
Catecholamine hormone receptors are reduced on chronic lymphocytic leukaemic lymphocytes.
Nature 269, 693 - 695 (1977)

126. SHOEMAKER D. G., LAUF, P. K.:
 ^3H -Ouabain binding and Na^+ , K^+ -ATPase in resealed human red cell ghosts.
J. Gen. Physiol. 81, 402 - 420 (1983)
127. SKOU, J. C.:
The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves.
Biochim. Biophys. Acta 23, 394 - 401 (1957)
128. STILES, G. L., TAYLOR, S., LEFKOWITZ, R. J.:
Human cardiac beta-adrenergic receptors: Subtype heterogeneity delineated by direct radioligand binding.
Life Sci. 33, 467 - 473 (1983)
129. TEREDESAI, P., PUSCHETT, J. B.:
Acute effects of piretanide in normal subjects.
Clin. Pharmacol. Ther. 25, 331 - 339 (1979)
130. WARD, J. P. T., CAMERON, I. R.:
Adaptation of the cardiac muscle pump to chronic potassium deficiency.
Cardiovasc. Res. 18, 257 - 263 (1984)
131. WERDAN, K., SCHNEIDER, G., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.:
Chronic exposure to low K^+ increases cardiac glycoside receptors in cultured cardiac cells: Different responses of cardiac muscle and non muscle cells from chicken embryos.
Biochem. Pharmacol. 33, 1161 - 1164 (1984)
132. WILEY, J. S., KRAFT, N., COOPER, I. A.:
The binding of ouabain to normal and chronic lymphocytic leukaemic lymphocytes.
Blood 54, 994 - 1000 (1979)
133. WILEY, J. S., SHALLER, C. C.:
Selective loss of calcium permeability on maturation of reticulocytes.
J. Clin. Invest. 59, 1113 - 1119 (1977)
134. WILLIAMS, L. T., SNYDERMAN, R., LEFKOWITZ, R. J.:
Identification of β -adrenergic receptors in human lymphocytes by $(-)-^3\text{H}$ -alprenolol binding.
J. Clin. Invest. 57, 149 - 155 (1976)
135. WILLIAMS, R. S., GUTHROW, C. E., LEFKOWITZ, R. J.:
 β -Adrenergic receptors of human lymphocytes are unaltered by hyperthyroidism.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 48, 503 - 505 (1979)
136. WILKINSON, P. R., ISSLER, H., HESP, R., RAFTERY, E. B.:
Total body and serum potassium during prolonged thiazide therapy for essential hypertension.
Lancet I, 759 - 762 (1975)

137. WINTROBE, M. M.:
Clinical Hematology.
Lea and Febiger, Philadelphia, 8th edition (1981)
138. ZUCKER-FRANKLIN, D.:
The percentage of monocytes among "mononuclear" cell
fractions obtained from normal human blood.
J. Immunol. 112, 234 - 240 (1974)

7. LEBENS LAUF

Am 2. Mai 1959 wurde ich in München als zweites Kind des Chefredakteurs Paul Ludwig und seiner Ehefrau Sigrid, geb. Harrer, geboren.

- | | |
|-------------|--|
| 1965 - 1969 | Volksschule an der Grandlstraße, München |
| 1969 - 1978 | Kurt-Huber-Gymnasium Gräfelfing/München |
| 1978 - 1985 | Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München |
| 1982 - 1985 | Doktorarbeit an der Medizinischen Klinik I der
Ludwig-Maximilians-Universität,
Klinikum Großhadern, Labor Professor Erdmann |
| 1984 - 1985 | Im Rahmen des Praktischen Jahres Ausbildung an
den chirurgischen Abteilungen des
Zentralklinikums Augsburg,
der Kinderklinik der Universität München im
Dr. von Haunerschen Kinderspital und der
Medizinischen Klinik I der Ludwig-Maximilians-
Universität, Klinikum Großhadern |
| Mai 1985 | Ablegen des Dritten Abschnitts der Ärztlichen
Prüfung und Approbation als Ärztin |

DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. E. Erdmann, schulde ich Dank für die Ermöglichung der Arbeit. Sein Interesse und seine anregende Kritik waren mir ein steter Ansporn.

Fräulein H. Schäffler und Frau M. Schober möchte ich für die Einführung in die Methodik, sowie Fräulein H. Schäffler für das Zeichnen der Abbildungen herzlich danken.

Herrn Dr. W. Münzing und Herrn P. Lang, Radiologische Klinik, Klinikum Großhadern, verdanke ich freundlicherweise die Ganzkörperkaliummessungen.

Herrn Dr. K. Possinger und Herrn R. Baumgart, Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern, danke ich für das Zuverfügungstellen der Zytozentrifuge, Herrn R. Baumgart außerdem für die Unterweisung in der Durchführung der Naphthol-AS-Acetat-Esterase-Färbung.

Frau C. Hörmann, Neurologischer Konsiliardienst der Innenstadtkliniken (Direktor: Prof. Dr. E. Frick), bin ich für das Erklären der Nylonsäulenfiltration zu Dank verpflichtet.

Mein besonderer Dank gilt allen jederzeit bereitwilligen Blutspendern, ohne die diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.

